



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 197 22 317 C 1**

⑦① Aktenzeichen: 197 22 317.6-41
⑦② Anmeldetag: 28. 5. 97
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 8. 10. 98

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 K 14/435
A 61 K 38/17
A 61 K 31/70
C 12 N 15/11
C 07 H 21/04
C 12 N 15/63
A 61 K 48/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53
// (A61K 38/17,31:70)

DE 197 22 317 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ **Patentinhaber:**
Boehringer Ingelheim International GmbH, 55218
Ingelheim, DE

⑦② **Erfinder:**
Hakamata, Yasuhiro, Dr., Jyohoku, Shizuoka, JP;
Nishimura, Seiichiro, Dr., Mino, Osaka, JP;
Barsoumian, Edward L., Dr., Toyonaka, Osaka, JP

⑤⑥ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:**
FEBS Lett. 394, S. 76-82, 1996;
Genomics 18 (1), S. 163-5, 1993;

⑤④ **Das Protein des humanen Ryanodinrezeptors vom Typ 3 sowie dafür kodierende DNA-Moleküle**

⑤⑦ Der Gegenstand der Erfindung umfaßt Nukleinsäuren
und Protein des humanen Ryanodinrezeptors vom Typ 3
(hRyR3), chimäre Ryanodinrezeptoren mit Anteilen des
menschlichen Rezeptors sowie Verfahren zur Herstellung
dieser Proteine. Ein weiterer Gegenstand der vorliegen-
den Erfindung betrifft den Nachweis von Ryanodinrezept-
oren in menschlichen Geweben zur Diagnose pathologi-
scher Zustände und Verfahren zur Identifizierung von Ak-
tivatoren oder Inhibitoren des hRyR3.

DE 197 22 317 C 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Der Gegenstand der Erfindung umfaßt Nukleinsäuren und Protein des humanen Ryanodinrezeptors vom Typ 3 (hRyR3), chimäre Ryanodinrezeptoren mit Anteilen des menschlichen Rezeptors sowie Verfahren zur Herstellung dieser Proteine. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft den Nachweis von Ryanodinrezeptoren in menschlichen Geweben zur Diagnose pathologischer Zustände und Verfahren zur Identifizierung von Aktivatoren oder Inhibitoren des hRyR3.

Zytoplasmatisches Kalzium spielt eine wichtige Rolle in der Zellaktivierung, Neurotransmitterfreisetzung, Muskelkontraktion und anderen biologischen Prozessen. Es wird durch den Einfluß extrazellulären Kalziums durch spannungsaktivierte und andere Ionenkanäle und über die Kalziumfreisetzung intrazellulärer Vorräte erhöht. Zur Zeit sind zwei intrazelluläre Kalziumfreisetzungskanäle bekannt, die Inositol 1,4,5-trisphosphatrezeptoren (IP3R) und die Ryanodinrezeptoren (RyR). Bei der Kalziumfreisetzung durch IP3R wird von einem ubiquitären Mechanismus ausgegangen, der für viele Zellen beschrieben wurde. Dagegen werden drei Typen von RyR-mRNA, RyR1, RyR2 und RyR3 gewebespezifisch exprimiert; RyR1 hauptsächlich in Skelettmuskel, RyR2 in Herzmuskel und Gehirn und RyR3 in Gehirn und glatter Muskulatur. Im Gehirn wird der RyR3 nur in sehr begrenzten Bereichen stark exprimiert, wie z. B. Hippocampus, Nucleus caudatus, Corpus callosum und Thalamus. Der RyR3 wird auch in nicht-erregbaren Zellen wie menschlichen T-Lymphozyten exprimiert. Eine Rolle des RyR3 in der Zellproliferation wird postuliert (Hakamata, Y. et al. FEBS Lett., 352 (1994), 206-210). Für RyR1 und RyR2 wurde gezeigt, daß bei der Erregungs-Kontraktions-Kopplung von Skelett- und Herzmuskel spannungsaktivierte Kalziumkanäle direkt den RyR1 in Skelettmuskel und wahrscheinlich auch in Neuronen aktivieren, während das Kalzium der spannungsaktivierten Kanäle ein Auslöser zur Öffnung von RyR2 in Herzmuskel ist (kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung).

Die Funktion des RyR3 ist Gegenstand einer Reihe von Spekulationen. Obwohl Kalzium ein wichtiger physiologischer Ligand von RyR3 zu sein scheint, spricht einiges dafür, daß die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung sich von derjenigen anderer RyR unterscheidet. Es wird angenommen, daß ein endogener RyR3 für die wesentlich geringere Kalziumempfindlichkeit der restlichen Kalziumfreisetzungaktivität von RyR1-defizienten Mausmuskelzellen verantwortlich ist. RyR3 ist nachweislich in einigen Fällen gegenüber Koffein unempfindlich, der hauptsächlich zur RyR-Aktivierung verwendeten Substanz. Da RyR3 in nicht-erregbaren Zellen exprimiert wird, die praktisch über keine spannungsaktivierten Kalziumkanäle verfügen, scheint es möglich, daß RyR3 durch andere Mechanismen reguliert wird als die übrigen RyR. RyR3-defiziente Mausmutanten weisen eine erhöhte lokomotorische Aktivität auf.

Die cDNA-Sequenzen von RyR1, RyR2 und für den Kaninchen-RyR3 (Hakamata et al. (1992) FEBS Lett. 312, 229-235) (rRyR3) sind bereits bekannt, während die Nukleinsäuresequenz des RyR3 im Menschen (hRyR3) noch nicht untersucht wurde.

Trotz vielfältiger Teilinformationen über den RyR3 sind seine molekularphysiologischen Eigenschaften, seine Bedeutung in pathologischen Zuständen sowie Verfahren zur Beurteilung möglicher Inhibitoren und Aktivatoren seiner Aktivität weitgehend oder sogar völlig unbekannt. Auch geht die Übertragung zur Zeit vorhandener Informationen aus Untersuchungen mit isolierten RyR3 nichthumanen Ursprungs auf den Menschen mit einer nicht unerheblichen Unsicherheit einher.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Bereitstellung der Nukleinsäuresequenz des humanen Ryanodinrezeptors vom Typ 3, seine Aminosäuresequenz sowie die Feststellung struktureller und physiologischer Besonderheiten, die den hRyR3 von allen anderen RyR unterscheiden.

Die Aufgabe konnte mit der vorliegenden Erfindung im Rahmen der Beschreibung und der Patentansprüche gelöst werden, indem Polypeptide zur Verfügung gestellt werden, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie mindestens 96% Aminosäuresequenzidentität mit dem humanen Ryanodin-Rezeptor vom Typ 3 (hRyR3) mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 7 aufweist.

In einer speziellen Ausführungsform umfaßt die vorliegende Erfindung den humanen Ryanodinrezeptor vom Typ 3 (hRyR3) mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 7.

Die bereitgestellten Polypeptide und funktionellen Derivate des hRyR3 ermöglichen es nun erstmals, den humanen RyR3 mit RyR-Typen anderer Spezies zu vergleichen und Unterschiede aufzuzeigen.

Die bereitgestellten erfindungsgemäßen Polypeptide umfassen den humanen RyR3 sowie seine "funktionellen Derivate", die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie aus einem erfindungsgemäßen Polypeptid als Fragment, Variante oder chemisches Derivat abgeleitet sind unter Erhalt der wesentlichen biologischen Aktivität des nativen humanen Ryanodinrezeptors vom Typ 3 (hRyR3) mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 7.

Unter dem der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Begriff "funktionelles Derivat" ist im Rahmen der Erfindung eine Komponente mit der biologischen Aktivität, die im wesentlichen ähnlich der biologischen Aktivität des nativen hRyR3 ist, gemeint. Die biologische Fähigkeit bezieht sich sowohl auf das Bindungsvermögen von Inhibitoren und Aktivatoren wie Koffein als auch von weiteren physiologischen Liganden des nativen Rezeptors sowie die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium. Ein "funktionelles Derivat" umfaßt aber auch Teile der hRyR, dessen biologische Eigenschaften durch Fragmente anderer Proteine wie z. B. anderer RyR verändert wurden. In einer besonderen Ausführungsform sei hier auf das Beispiel eines chimären Rezeptors aus hRyR3 und rRyR2 verwiesen. Der Ausdruck "funktionelle Derivate" soll "Fragmente", "Varianten" und "chemische Derivate" umfassen.

Der Ausdruck "Fragment" bezieht sich auf jedes Polypeptid, das gemessen am nativen Rezeptor, eine verkleinerte Form darstellt und mindestens eine Bindungsstelle für einen Liganden des hRyR aufweist.

Eine "Variante" umfaßt Moleküle, die im wesentlichen in Funktion und Struktur vom nativen hRyR3 abgeleitet sind, wie z. B. alle Formen. Demnach beinhaltet der Ausdruck "Variante" z. B. die Moleküle, die eine ähnliche Aktivität, aber z. B. eine veränderte Aminosäuresequenz haben.

Ein chemisches Derivat schließt zusätzliche chemische Gruppen ein, die normalerweise nicht Teil des Moleküls sind. Diese Gruppen können z. B. die biologische Aktivität des Moleküls verstärken oder abschwächen.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft chimäre Polypeptide, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie neben

mindestens einem Fragment des humanen Ryanodinrezeptors vom Typ 3 (hRyR3) mindestens ein weiteres Fragment eines anderen Polypeptids enthalten.

In einer besonderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung chimäre Polypeptide, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie neben einem Fragment des hRyR3 mindestens ein weiteres Fragment aus der Familie der nicht humanen Ryanodinrezeptoren enthalten.

In einer speziellen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung chimäre Polypeptide, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie neben einem Fragment des hRyR3 mindestens ein Fragment des Kaninchen-Ryanodin-Rezeptors Typ 2 (rRyR2) enthalten.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein chimäres Polypeptid, daß dadurch gekennzeichnet ist, daß es im Bereich der Aminosäure 1300 des hRyR3 ein Fragment des rRyR2 enthält, welches hohe Kalzium- bzw. Koffeinempfindlichkeit verleiht.

Aufgrund der im Vergleich zu den anderen RyR-Typen geringeren Kalziumfreisetzungsaktivität des RyR3 ist die Messung der Kalziumfreisetzung durch bekannte Aktivatoren wie z. B. Koffein ungenau oder sogar nicht möglich. Dies hat große Bedeutung für die Identifizierung möglicher Inhibitoren oder Aktivatoren der biologischen Wirkung des RyR3. Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß ein chimäres Polypeptid, das über eine erhöhte Kalzium- bzw. Koffeinempfindlichkeit verfügt, aus einem Fragment des RyR vom Typ 3 und einem anderen Protein hergestellt werden kann. In einer besonderen Ausführungsform wird ein chimäres Polypeptid aus einem Anteil hRyR3 und einem nichthumanen Anteil, wie z. B. einem Fragment des Kaninchen-rRyR2, vorgestellt. Überraschenderweise wurde gefunden, daß das Ersetzen des hRyR3 im Bereich der Aminosäure 1300 durch einen Teil des rRyR2 eine erhöhte Koffein- bzw. Kalziumempfindlichkeit vermittelt. Diese erhöhte Kalzium- bzw. Koffeinempfindlichkeit ermöglicht nun dem Fachmann in hochsensiblen Testsystemen, z. B. in vivo Zellsystemen, Aktivatoren und Inhibitoren durch ihren Einfluß auf den intrazellulären Kalziumgehalt zu bestimmen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide mit der biologischen Aktivität des nativen hRyR3 kodieren. Nukleinsäuren umfassen DNA sowie auch RNA. Alle erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zeichnen sich dadurch aus, daß sie mit einer Nukleinsäure entsprechend der erfindungsgemäßen Polypeptidsequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Unter stringenten Bedingungen hybridisieren DNA-Sequenzen mit mehr als 85% Homologie und bevorzugt mit einer Homologie von mehr als 90%. Unter stringenten Bedingungen versteht der Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie Hybridisierungsbedingungen wie sie z. B. in "Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd. Ed., Sambrook, Fritsch, Maniatis; Cold Spring Harbor Press, 1989" und "Haymes, B. D. et al., Nucleic Acid Hybridisation, a Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985)" beschrieben werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kodieren diese DNA-Moleküle für chimäre Polypeptide, die neben einem Anteil hRyR3 mindestens ein weiteres DNA-Fragment enthalten, das z. B. aus der Familie der Ryanodinrezeptoren stammen kann. In einer besonderen Ausführungsform wird eine Nukleinsäure für ein chimäres Polypeptid aus einem Fragment des hRyR3 zur Verfügung gestellt, dessen Bereich um die Aminosäure 1300 durch ein Fragment des Kaninchen RyR2 ersetzt wurde.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform umfasst die Erfindung alle zur rekombinanten Darstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide notwendigen Nukleinsäuresequenzen. Die Sequenzen schließen somit alle zusätzlichen Sequenzen ein, die zur rekombinanten Herstellung der Polypeptide notwendig sind, wie z. B. Vektor- und Wirtsnukleinsäuren.

In einem zusätzlichen Aspekt wird von der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide bereitgestellt, daß dadurch gekennzeichnet ist, daß eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in eine Zelle oder ein zellfreies In-Vitro-Translations-System eingebracht wird. Ferner ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Bestandteil eines Expressionsvektors sein kann. Entsprechende verwendbare Expressionsvektoren, Zellen, zellfreie In-Vitro-Translations-Systeme sowie die notwendigen Methoden zur Herstellung der Polypeptide sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie geläufig.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide und/oder Nukleinsäuren als Pharmazeutikum oder als Bestandteil eines Pharmazeutikums, bzw. die Verwendung der Polypeptide und/oder zur Behandlung von hRyR3 assoziierten Erkrankungen.

Ferner umfasst die Erfindung jedoch auch Nukleinsäuren als Pharmazeutikum oder als Bestandteil eines Pharmazeutikums, die der Nukleinsäure eines der erfindungsgemäßen Proteine komplementär ist. Solche komplementären Nukleinsäuren sind dem Fachmann unter dem Namen "Antisense"-Nukleinsäuren bekannt und ihre therapeutische Bedeutung ist dem Fachmann geläufig.

Ein zusätzlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie deren Nukleinsäuren zum Nachweis der erfindungsgemäßen Polypeptide sowie deren Nukleinsäuren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide ermöglichen nun erstmals die Bereitstellung hochspezifischer immunologischer Methoden, diese Polypeptide in geringen Konzentrationen nachzuweisen.

In einer besonderen Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptids zur Herstellung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper zum Nachweis eines erfindungsgemäßen Polypeptids.

Immunologische Methoden, wie z. B. die Herstellung, Reinigung und Anwendung monoklonaler und polyklonaler Antikörper zum quantitativen und qualitativen hochspezifischen Nachweis von Peptiden sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt. Ferner umfasst die Erfindung in einer weiteren besonderen Ausführungsform auch den molekularbiologischen Nachweis der für die Polypeptide kodierenden Nukleinsäure. Molekularbiologische Nachweise sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bestens bekannt und umfassen u. a. Hybridisierungs- und PCR- (Polymerase Chain Reaction) Methoden.

In einer besonderen Ausführungsform ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder eines Teils einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zum Nachweis einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß eine zu dieser Nukleinsäure oder zu einem Teil dieser Nukleinsäure komplementäre Nukleinsäure zur Hybridisie-

5 rung eingesetzt wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst die Verwendung der bereitgestellten Polypeptide und/oder Nukleinsäuren zur Bestimmung möglicher Inhibitoren und Aktivatoren des hRyR3.

5 Demzufolge umfasst die vorliegende Erfindung auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur in vitro- und/oder in vivo-Identifizierung von Aktivatoren und/oder Inhibitoren des hRyR3, die dadurch gekennzeichnet ist, daß eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in eine Zelle oder ein zellfreies System eingebracht und exprimiert wird, das Expressionsprodukt einem potentiellen Inhibitor oder Aktivator ausgesetzt wird und der durch das Expressionsprodukt vermittelte Ionenfluß gemessen wird.

10 Der Begriff in vitro bezieht sich auf zellfreie, der Begriff in vivo auf Zellsysteme. In einer besonderen Ausführungsform werden Aktivatoren und/oder Inhibitoren in membranumschlossene zellfreie Systeme eingebracht, die die erfindungsgemäßen Polypeptide exprimieren und nach Zusatz potentieller Aktivatoren und Inhibitoren die Änderung der Ionenkonzentration im membranumschlossenen Raum bestimmt. In einer ganz besonderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung erstmals durch die Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide in RyR-defizienten Zellen ein System in vivo zur Verfügung, daß es ermöglicht, Aktivatoren und Inhibitoren des hRyR3 in isolierten Zellen zu bestimmen. Methoden zur Expression von Polypeptiden in Zellen und zellfreien Systemen unter Verwendung der entsprechenden Nukleinsäure sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt. Neben der Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide in Zellen oder zellfreien Systemen umfasst die Erfindung in einer ganz besonderen Ausführungsform auch die Injektion der Polypeptide in diese Zellen und Systeme zur Identifikation von Inhibitoren und/oder Aktivatoren nach den oben beschriebenen Methoden. Die Identifizierung von potentiellen Inhibitoren und Aktivatoren erfolgt durch 20 Nachweis des veränderten Einflusses des Expressionsprodukts auf die Zelle. Der veränderte Einfluss des Peptids bzw. Expressionsprodukts ist durch den vermittelten Ionenfluss meßbar bzw. durch die Veränderung der Ionenkonzentration im membranumschlossenen Raum. Im allgemeinen wird die Konzentration intrazellulärer Kalziumionen gemessen. Ein beispielhafter Versuchsaufbau eines solchen Verfahrens zur Bestimmung von Aktivatoren oder Inhibitoren besteht z. B. aus einem hRyR3 exprimierenden Zellsystem oder zellfreien System, das über keinerlei oder nur geringe endogene Ryanodinrezeptoraktivität verfügt, wobei nach dem Zusatz von potentiellen Inhibitoren oder Aktivatoren eine meßbare Änderung der Ionenkonzentration innerhalb des Zellsystems oder des membranumschlossenen Raums bestimmt wird. Für den RyR1 und RyR2 sind Systeme zur Bestimmung von Aktivatoren und Inhibitoren bereits bekannt.

In einem weiteren zusätzlichen Aspekt umfasst die vorliegende Erfindung den Nachweis der erfindungsgemäßen Polypeptide und/oder des hRyR3, zur Diagnose von pathologisch veränderten Geweben.

30 In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung können die erfindungsgemäßen Polypeptide und/oder Nukleinsäuren zur Herstellung eines Diagnostikums verwendet werden, welches deren Verwendung zur Diagnose von pathologischen Zuständen, wie z. B. die Überexpression oder der Mangel an hRyR3 in Geweben, ermöglicht, die dadurch gekennzeichnet ist, daß das Vorhandensein, die Überexpression oder der Mangel eines der erfindungsgemäßen Polypeptide nachgewiesen wird. Eine ganz besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von Antikörpern zur Diagnose pathologischer Zustände durch den immunologischen Nachweis der erfindungsgemäßen Polypeptide durch Antikörperbindung.

Unter einem pathologischen Zustand eines Gewebes versteht der Fachmann jegliche Abweichung der physiologischen Normalverhältnisse wie sie bei der Mehrheit eindeutig gesunder Gewebe ausgeprägt sind. Die Feststellung der Überexpression oder des Mangels der erfindungsgemäßen Polypeptide in Geweben und Zellen kann sowohl durch immunologische Methoden als auch durch den molekularbiologischen Nachweis der für die Polypeptide kodierenden Nukleinsäure erfolgen.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Diagnose pathologischer Zustände, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die für das erfindungsgemäße Polypeptid kodierende Nukleinsäure nachgewiesen wird.

45 Entsprechende molekularbiologische Nachweise sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bestens bekannt und umfassen u. a. Hybridisierungsmethoden und PCR-(Polymerase Chain Reaction) Methoden. Ferner erlaubt die vorliegende Erfindung durch Bereitstellung der Nukleinsäuresequenz des hRyR3 dem Fachmann erstmals die Darstellung hochspezifischer hRyR3-Hybridisierungssonden, mit denen die Gegenwart oder der Mangel an Nukleinsäuren des hRyR3 in Geweben nachgewiesen werden kann. Auch können nun hochspezifische Sonden zum Nachweis des hRyR3 durch PCR ("Polymerase Chain Reaction") entwickelt werden. Dadurch können erfindungsgemäß pathologische Zustände in Geweben durch molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird im folgenden die Sequenz und molekularphysiologische Charakterisierung der cDNA-Sequenz des erfindungsgemäßen nativen Peptids des hRyR3 offenbart. Die cDNA Sequenz wurde durch dem Fachmann bekannte molekularbiologische Hybridisierungsmethoden und anschließendes Sequenzieren mehrerer 55 überlappender cDNA-Klone identifiziert und charakterisiert. (Siehe Beispiel 1). Die Primärstruktur des erfindungsgemäßen nativen Polypeptids ist durch den Vergleich des korrespondierenden Leserasters der Aminosäuresequenz des Kaninchen-RyR3 bestimmt worden (Hakamata, Y. et al. FEBS Lett. 312 (1992), 229-235). Die Aminosäuresequenz des nativen Polypeptids ist 4866 Aminosäuren lang und entspricht einem Molekulargewicht von 551046 Da. Fig. 1 zeigt die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des hRyR3. Die Nukleotidsequenz GAGCCATGG im Bereich um das translationale Initiationskodon stimmt gut mit der Konsensusinitiationssequenz CCA(G)CCATGG überein (Kozack M. Nucleic. Acids. Res. 12 (1984), 857-872). Die 3'-nichtkodierende Region ist 873 Nukleotide lang (ohne den poly (da)-Bereich); das Polyadenylierungssignal AATAAA (Goeddel, D. V. et al. Nature 290 (1981), 20-26) befindet sich 21 Nukleotide oberhalb des poly (da)-Bereichs. Der Aminosäuresequenzvergleich weist jeweils über 90% (ca. 96%) Identität zwischen hRyR3/rRyR3 auf, bzw. über 60% Identität zwischen hRyR3/rRyR2 (ca. 69%) sowie hRyR3/RyR1 (ca. 67%). Das 65 Hydropathizitätsprofil des hRyR3 ist vergleichbar mit denen von Kaninchen-rRyR3, rRyR2, rRyR1 sowie humanem RyR1 insoweit, daß keine hydrophobe aminoterminal Sequenz, die eine Signalsequenz anzeigt, vorhanden ist und, daß die restlichen Bereiche hauptsächlich hydrophil sind sowie, daß sich vier stark hydrophobe Segmente (benannt als M1, M2, M3 und M4) im carboxy-terminalen Ende befinden. Besonders gut konserviert in allen RyR ist die carboxyterminale

Region im Bereich der M3- und M4-Segmente. Es sind auch deutliche Unterschiede vorhanden. So fehlt z. B. sowohl in hRyR3 als auch in rRyR3 in der Nähe der Aminosäure 1300 ein Bereich von etwa 100 Aminosäuren; RyR2 hat in dieser Region eine EF-IIand-Konsensussequenz (Moncrief, N. D. J. Mol. Evol. 30 (1990), 522–562) (im Bereich der Aminosäuren 1336–1347) und eine Nukleotidbindungskonsensussequenz GXGXXG (Wierenga, R. K. Nature 302 (1983), 842–844) (Aminosäurereste 1324–1329) (Nakai, J. et al. FEBS Lett. 271 (1990), 169–177). Desweiteren unterscheidet sich die Region direkt vor dem M1-Segment, in der eine Divergenz zwischen hRyR3 und rRyR3 besteht. Der hRyR3 verfügt über vier sich wiederholende Sequenzen in zwei Tandempaaaren (Aminosäurereste 841–954, 955–1070, 2600–2711 und 2712–2791). Potentielle Ligandenbindungsstellen sind über vorgeschlagene Konsensusaminosäuresequenzen bestimmbar. Eine dem Motif der EF-Hand (Moncrief, N. D. J. Mol. Evol. 30 (1990), 522–562) ähnliche Sequenz ist bei Aminosäureresten 3928–3939 erkennbar, eine Region, die auch in rRyR3, RyR2 und RyR1 relativ gut konserviert ist. Desweiteren ist eine potentielle Calmodulin-Bindungsstelle (Aminosäuren 3465–3476), bestehend aus einer amphipathischen Helix mit zwei Gruppen positiver Ladungen, die durch eine hydrophobe Region getrennt sind (Blumenthal, D. K. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 (1985), 3187–3191), besonders gut in rRyR3, rRyR2 und rRyR1 konserviert. Das Molekül weist vier Kopien der Nukleotidbindungskonsensussequenz GXGXXG (Wierenga, R. K. Nature 302 (1983), 842–844) (Aminosäurereste 697–702, 699–704, 1135–1140, 2235–2240 und 2524–2529) auf, von denen die Aminosäuren 2235–2240 in rRyR3, rRyR2 und rRyR3 gut konserviert sind. Durch Verwendung der Konsensussequenz RXXS/T, ergeben sich 21 potentielle Phosphorylierungsstellen für Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen, von denen vier (Serinrest 2707 und die Threoninreste 130, 290, und 4150) in rRyR3, rRyR2 und rRyR3 konserviert sind. Es sind zwei potentielle cAMP-abhängige Phosphorylierungsstellen (Threoninreste 1244 und 4158), definiert als KRXXS/T oder RXXS/T (Kemp, B. E. and Pearson R. B. Trends. Biochem. Sci. 15 (1990), 342–346), vorhanden, die jedoch nicht in rRyR konserviert sind. All diese potentiellen Bindungsstellen sind auf der wahrscheinlich zytoplasmatischen Seite, entsprechend des Transmembrantopologiemodells (Takeshima, H. et al. Nature 339 (1989), 439–445), angeordnet. Argininrest 613 oder 614, dessen Ersatz durch Cystein in RyR1 mit maligner Hyperthermie (MH) in Schwein und Mensch assoziiert ist, ist in allen drei Typen von RyR konserviert. Es ist nun möglich, durch Vergleich der Primärstruktur des hRyR3 mit anderen Ryanodinrezeptoren, quantitative und qualitative Aussagen über seine molekularen Eigenschaften zu machen. Dem Fachmann auf dem Gebiet der Proteinchemie bietet die Primärstruktur des nativen Proteins desweiteren die Möglichkeit, Struktur- und Bindungsmodelle, die bei der Aufklärung der physiologischen Funktion und der Bestimmung möglicher Inhibitoren und Aktivatoren dieses Rezeptors hilfreich sind, zu entwerfen.

Die funktionelle Untersuchung des RyR3 hat bis jetzt noch keinen direkten Nachweis seiner Funktion als Kalziumfreisetzungskanal zeigen können. In einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurde nun erstmals die funktionelle rekombinante Expression des des hRyR3 durch Myotuben aus Mäusen ohne die Skelettmuskelform des RyR (Nakai, J. et al. Nature 380 (1996), 72–75) gezeigt. Die Expression des Wildtyp-hRyR3 in Myotuben aus RyR1-defizienten (dyspedischen) Mäusen durch Injektion der cDNA in die Kerne ist möglich, aber bedingt durch eine endogene Koffeinreaktion der dyspedischen Myotuben durch Koffein schlecht nachweisbar, da der Unterschied zwischen der Koffeinreaktion von nicht-injizierten Myotuben und mit RyR3-cDNA injizierten Myotuben nur undeutlich ist (10 mM Koffein). Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da hRyR3 in humanen T-Lymphozyten auch keine Koffeinreaktion aufzeigen (Hakamata, Y. et al. FEBS Lett. 352 (1994), 206–210). Es wird angenommen, daß Koffein durch die Verstärkung der Kalziumempfindlichkeit auf den RyR wirkt. Deshalb wurde in erfinderischer Weise die Aufgabe gelöst, eine erhöhte Kalziumempfindlichkeit in den RyR3 einzubringen. Ausgehend von der Annahme, daß die fehlende Region um den Aminosäurerest 1300 die kalziumempfindlichkeitsbestimmende Region enthält, ist es möglich, ein chimäres RyR-Molekül herzustellen, in dem die fehlende Region durch eine Sequenz des RyR2 ersetzt wird, welcher eine hohe Kalziumempfindlichkeit aufweist. Ein solches chimäres Molekül des RyR kann z. B. zu einem Drittel aus der rRyR2-Aminosäuresequenz im N-Terminus und zu zwei Dritteln aus der hRyR3-Sequenz im C-Terminus bestehen (Fig. 2A). Fig. 2B zeigt eine Koffeinreaktion des in dyspedischen Myotuben exprimierten chimären RyR. Der chimäre RyR reagiert auf 1 mM Koffein (Fig. 2B, n = 5 von 20). Dagegen zeigen nicht-injizierte dyspedische Myotuben keinerlei Reaktion auf 1 mM Koffein (Fig. 2B, n = 0 von 20). Dadurch wird erstmals gezeigt, daß chimäre RyR intrazelluläre Kalziumkanäle ausbilden können, die auf Koffein reagieren. Basierend auf der Strukturvorhersage der RyR-Aminosäuresequenz liegt die kanalbildende Region des RyR im C-terminalen Zehntel der RyR-Moleküle (Takeshima, H. et al. Nature 339 (1989), 439–445; Nakai, J. et al. FEBS Lett. 271 (1990), 169–177; Hakamata, Y. et al. FEBS Lett. 312 (1992), 229–235; Zorzato, F. et al. J. Biol. Chem. 265 (1990), 2244–2256). Es ist davon auszugehen, daß die C-terminalen zwei Drittel des hRyR3 die Kalziumfreisetzungskanalaktivität beinhalten und, daß das N-terminale Drittel der RyR-Sequenz die Region, die die Koffein und/oder Kalziumempfindlichkeit bestimmt, enthält.

Eine ganz besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft den Nachweis von hRyR3 in Geweben. Dieses ist mit hRyR3-spezifischen Sonden und der Northern-Blot-Analyse von mRNA aus diversen menschlichen Geweben möglich. Es kann gezeigt werden, daß, obwohl in Gesamtgehirn nur ein schwaches Signal für RNA beobachtet werden kann, ein ca. 16 kb großes RNA-Stück mit hRyR-cDNA-Proben in relativ großer Menge in begrenzten Gehirnbereichen wie Nucleus caudatus, Amygdala und Hippocampus sowie in etwas geringeren Mengen in Corpus callosum, Substantia nigra und Thalamus (Fig. 3) hybridisiert. Die begrenzte Verteilung von RyR3 im menschlichen Gehirn ermöglicht die folgenden Annahmen. Es ist bekannt, daß der RyR auch im Gehirn direkt an L-Typ-Kalziumkanäle gekoppelt ist. Während P-Typ und andere Typen von Kalziumkanälen im ganzen Gehirn exprimiert werden, wird der R-Typ-Kalziumkanal nur in den sehr begrenzten Regionen des Gehirns, wie im Nucleus caudatus und Hippocampus exprimiert (Niidome, T. et al. FEBS Lett. 308 (1992), 7–13). Bei einer ähnlichen Verteilung von R-Typ-Kalziumkanal und RyR3 ist es wahrscheinlich, daß der RyR3 direkt mit dem R-Typ-Kalziumkanal in diesen Regionen wechselwirken kann. Da die Regionen der RyR3-Expression auch grob mit den Gebieten korrespondieren, in denen der "verzögerte neuronale Tod" nach Hypoxie im Gehirn stattfindet, ist es wahrscheinlich, daß dieser Typ des RyR eine wichtige Rolle in pathologischen Zuständen spielt. Die erhöhte lokomotorische Aktivität von RyR3-defizienten Mäusen reflektiert diese Verteilung des RyR3.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel kann gezeigt werden, daß auch außerhalb des Gehirns in Skelettmuskel der

Nachweis einer RNA-Spezies gelingt, die mit hRyR3-cDNA-Proben hybridisiert (Fig. 4). Die Größe der RNA-Spezies dieser Gewebe von ca. 16 kb entspricht der Spezies im Gehirn. Ein schwaches Signal legt die Existenz von RyR3-mRNA in Herzgewebe nahe. Die Verteilung von mRNA außerhalb des Gehirns unterscheidet sich vom Kaninchen, da die RyR3-Expression in Kaninchenskelettmuskel nicht nachweisbar ist. Bedingt durch den großen Gehalt an RyR1-mRNA in Skelettmuskel ist ein geringer Beitrag durch Kreuzhybridisierung von RyR3-Proben mit RyR1-mRNA nicht ausgeschlossen. Allerdings führte mRNA aus Herz zu einem wesentlich geringeren Hybridisierungssignal, trotz der höheren Homologie von RyR3 mit RyR2 im Vergleich zu RyR1. Dieses, zusammen mit der Isolierung von RyR3-cDNA aus einer cDNA-Bibliothek aus Skelettmuskel, deutet daraufhin, daß RyR3 tatsächlich in Herzmuskel exprimiert wird. Zudem ist RyR3 in Skelettmuskel anderer Spezies wie z. B. Maus, Vogel und Frosch nachweisbar.

- 10 In einem weiteren Ausführungsbeispiel zum Nachweis des hRyR3 wird gezeigt, daß die RyR3-Expression zwischen den Spezies variiert und, daß die RyR3-Expression in humanem Skelettmuskel stärker ausgeprägt ist als in anderen Spezies. Es ist bekannt, daß eine akute Erhöhung von intrazellulärem Kalzium in menschlichem Skelettmuskel maligne Hyperthermie (MH) auslöst (MacLennan, D. H. and Philips, M. S. Science 256 (1992), 789-794). Obwohl MH mit Mutationen von RyR1 assoziiert wird (Gillard, E. F. et al. Genomics 11 (1991), 751-755), weisen nur 5% der MH-Fälle eine
- 15 Mutation in Position 614 des RyR1-Gens durch Arg zu Cys Substitution auf. Die reichliche Expression von RyR3 in menschlichem Skelettmuskel macht eine Beteiligung des RyR3 an varianten Formen von MH sehr wahrscheinlich. Zudem besteht die Möglichkeit, daß der RyR3 auch an anderen Störungen der intrazellulären Kalziumregulation beteiligt sein könnte.

- In einer weiteren ganz besonderen Ausführungsform wurde deshalb festgestellt, daß der hRyR3 bei pathologischen Zuständen im Menschen vorhanden ist und in pathologisch veränderten Geweben nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurde an Zelllinien, abgeleitet aus humanen Gehirntumoren, gezeigt, daß die gewebespezifische Verteilung des RyR3 in menschlichem Gehirn in Zusammenhang mit der zellspezifischen Kalziumregulation bei der Proliferation steht. RyR3-mRNA wird in mehreren menschlichen Zelllinien exprimiert (Fig. 5). Eine reichliche Expression ist in U373 feststellbar, einer Zelle aus malignem Astrozytoma, eine schwache Expression in IMR-32 aus malignen Neuroblastomazellen sowie einer noch geringeren Expression in H4 aus malignen Neurogliomazellen. Trotz der RyR2-Expression in IMR-32 sind keine weiteren RyR-Typen in U373 oder H4 feststellbar. RyR3-Expression in den neuronalen Zellen SK-N-MC oder SK-N-SH konnte trotz ihrer Malignität nicht nachgewiesen werden. U373 und H4 reagierten auf Ryanodin, nicht jedoch auf Koffein mit einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums, während eine Koffeinreaktion unter gleichen Bedingungen in RyR2-exprimierenden CHO-Kaninchenzellen nachweisbar ist (Fig. 6). Die Ryanodin- und Koffeinreaktionen von U373 und H4 ist auch in T-Lymphozyten zu beobachten, ein typisches Merkmal für RyR3 (Hakamata, Y. FEBS Lett. 352 (1994), 206-210).

Beispiele

1. Klonierung der cDNA

- Es wurden Oligo (dT)- und Zufalls-Primer- cDNA-Bibliotheken aus menschlichem Gehirn (Nucleus caudatus) der Firma Clontech (USA) verwendet, die aus poly(A)⁺RNA isoliert und in λ gt10 Phagen einkloniert wurden. Das Durchsuchen der cDNA-Bibliotheken ($\sim 3,0 \times 10^5$ Plaques) mit dem Fragment PstI(9790)/EcoRI(11834) aus dem Kaninchen RyR3 cDNA-Klon pBRR74 (9) führte zu λ hBRR79. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen werden durch Zahlen (in Klammern) gekennzeichnet, die das aus der Spaltung hervorgehende 5'-terminale Nukleotid beschreiben: die Nukleotidreste sind in 5'-3'-Richtung nummeriert, angefangen mit dem ersten Rest des ATG-Triplets, das das wahrscheinlich initiiierende Methionin kodiert. Das Subklonieren des cDNA-Inserts von λ hBRR79 in die EcoRI Schnittstelle von pBluescript SK(-) (Stratagene) führte zu phBRR79. Die Bibliothek wurde neun mal mit verschiedenen Proben durchsucht:

Verwendetes Fragment:	Ergebnis: (positive Klone)
2,4-kb (Kilobasen) EcoRI(Vector)/ DraI(2395) aus pBRR331	λ hBRR22, λ hBRR61, λ hBRR112
1,2-kb PmaCI(4750)/ApaI(5912) aus pBRR133 (9)	λ hBRR51, λ hBRR52, λ hBRR53
1,3-kb EcoRI(Vector)/HindIII(14656) aus pBRR110 (9)	λ hBRR91, λ hBRR93
1,3-kb KpnI(6249)/HindIII(7523) aus pBRR121 (9) und 1,1-kb XbaI(8405)/ PstI(9494) aus pBRR92 (9)	λ hBRR140, λ hBRR141, λ hBRR411
1,0-kb EcoRI(Vector)/EcoRI(13335) aus λ hBRR93 und 0,8-kb SpeI(10569)/ EcoRI(11408) aus λ hBRR79	λ hBRR161
0,8-kb EcoRI(Vector)/(EcoRI(11815) aus λ hBRR161	λ hBRR407

Desweiteren wurden zwei zusätzliche Klone durch RT-PCR gewonnen. 1 μ g poly(A)⁺RNA (Clontech) aus menschlichem Gehirn wurde zusammen mit RNase H⁻Reverse Transkriptase aus Moloney's murinem Leukemievirus (Gibco BRL) mit Zufallsprimer inkubiert. Der erste synthetisierte cDNA-Strang wurde entsprechend der Herstellerangaben (TaKaRa LA PCR Kit) mit Hilfe eines DNA Thermal Cycler's (Perkin-Elmer Corp.) amplifiziert. Nach einem Heißstart (1 min, 94°C) wurden die Proben 30 Zyklen von 20 s bei 98°C und 5 min bei 68°C ausgesetzt. Primerpaare für phBRR501 waren jeweils synthetische 25-Nukleotidoligomere der Basen 2949–2973 (oberer Primer, AGTGGATAA-ACTTGAGAAAATGCA) und 3495–3519 (unterer Primer, TGGGGAGCTGCTGATACCAATAAA) der phBRR61- und der phBRR51-Klone. Primerpaare für phBRR502 waren jeweils synthetische 20-Nukleotidoligomere der Basen 11369–11388 (oberer Primer, TTGATGATGAATCTGGACAGCAC) und 12353–12372 (unterer Primer, ACGTGT-TAGAAATTGCGGGT) der phBRR79- und der phBRR91-Klone.

Die cDNA-Klone zur Nukleotidsequenzanalyse waren: phBRR22 (mit den Nukleotiden -86 bis 1263), phBRR61 (991–3103), phBRR501 (2949–3519), phBRR51 (3435–5253), phBRR53 (4444–7346), phBRR411 (7330–9900), phBRR79 (8358–11408), phBRR502 (11369–12372) und phBRR91 (11468–15486). Alle cDNA-Einschübe außer phBRR501 und phBRR502 wurden in die EcoRI-Schnittstelle von pBluescript SK(-) subkloniert. Das 0,6-kb HindIII (2956)/BclI (3506) Fragment von phBRR501 wurde in die BamHI/HindIII Schnittstelle und das 0,5-kb ApaI (11451)/AclI (11930) Fragment von phBRR502 in die AclI/ApaI Schnittstelle von pBluescript SK(-) subkloniert.

Beide Stränge der resultierenden cDNA und die PCR-Produkte der Reversen Transkriptase wurden über die Dideoxy-Ketten-Terminations-Methode sequenziert (Sanger, F. et al., Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A., 74, (1977), 5463–5467).

2. Physiologische Charakterisierung

Die gesamte proteinkodierende Sequenz des humanen RyR3 wurde in die EcoRI/NotI-Schnittstelle von pCl-neo (Promega) einkloniert und resultierte in hNRR9. Das cDNA-Insert wurde aus den folgenden Fragmenten konstruiert: EcoRI (Vector)/MroI (1232) erhalten aus IhBRR22, MroI (1232)/HindIII (2956) aus IhBRR61, HindIII (2956)/BclI (3506) aus IhBRR501, BclI (3506)/PmaCI (4750) aus IhBRR51, PmaCI (4750)/PstI (7339) aus IhBRR53, PstI (7339)/ClaI (9559) aus IhBRR411, ClaI (9559)/SpeI (10569) aus IhBRR79, SpeI (10569)/ApaI (11451) aus IhBRR407, ApaI (11451)/EcoRI (11815) aus IhBRR502, EcoRI (11815)/EcoRI (14861) aus IhBRR91. Das Expressionsplasmid der chimären Ryanodine Receptor cDNA aus humanem RyR3 und dem Kaninchen-RyR2 wurde wie folgt konstruiert: Das SalI (vector)/PmaCI (5038) Fragment aus der Kaninchen-RyR2 cDNA (Nakai, J. et al FEBS Lett. 271 (1990), 169–177) und das PmaCI (4750)/NotI (vector) Fragment aus der humanen RyR3-cDNA wurde in die SalI/NotI-Schnittstelle von pCl-neo ligiert. Kulturen von Myotuben aus RyR1-defizienten (dyspedischen) Mäusen und cDNA-Injektion sind bereits bekannt (Nakai, J. et al., Nature 380, (1996), 72–75). Fluoreszenzänderungen (dimensionslose willkürliche Einheiten) wurden nach der Beladung der Myotuben mit Fluo-3 AM gemessen (Garcia, J., und Beam, K. G., J. Gen. Physiol. 103, (1994), 107–123). Koffein wurde durch lokale Injektion mit Hilfe einer "wide-tipped"-Pipette (10–50 mm Durchmesser) appliziert. Als Waschlösung wurde normale Nager-Ringer-Lösung der folgenden Zusammensetzung verwendet (mM): 145 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7,4 mit NaOH eingestellt. Die Temperatur betrug 20–22°C.

3. Northern Blot Analyse

Zur Northern-Blotanalyse von humanem Gehirn und anderen Geweben wurden käufliche Multiple Tissue Northern (MTN) Blots (Clontech) verwendet. Jede Bahn der MTN-Blots enthält ungefähr 2 μ g poly(A)⁺RNA aus den folgenden

Hirnregionen: Amygdala, Nukleus caudatus, Corpus callosum, Hippocampus, Gesamtgehirn, Substantia nigra, subthalamischen Nucleus und Thalamus. Jede Bahn des anderen MTN-Blots enthält ungefähr 2 mg poly(A)⁺RNA der folgenden humanen Gewebe: Herz, Gehirn, Placenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas. Jede Bahn des dritten Blots enthält ungefähr 20 mg Gesamt-RNA der folgenden humanen Zelllinien (Hakamata Y., et al. FEBS Lett. 312 (1992), 229–235): SK-N-MC (abgeleitet aus ursprünglichen Neuroblastoma), IMR-32 (Neuroblastoma), HEL-299 (Lungenfibroblast), H4 (Neuroglioma), SK-N-SH (Neuroblastoma), HEK-293 (embryonale Nierenzelle) und U373 (Astrocytoma). Da die aus cDNA-Teilen des humanen Ryanodin-Rezeptors gewonnenen Sonden nur schwache Signale ermöglichen, wurde für die Northern Blot Analyse das 14,9-kb Nall(Vector)/NotI(Vector) Fragment aus phNRR9 verwendet. Die Probe wurde mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase und [³²P] dCTP (Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. Anal. Biochem. 132 (1983), 6–13) durch Zufallsoligonukleotidprimer hergestellt. Der Blot wurde bei 42°C hybridisiert und drei mal mit 0,3 × SSC, 0,1% SDS bei 50°C gewaschen.

4. Lumineszenz-Bestimmung

Die Lumineszenz-Bestimmung wurde wie erst kürzlich veröffentlicht durchgeführt (Maeda, A. et al., Anal. Biochem. 242, (1996), 58–66). Dazu wurden die Zellen (1×10^5 Zellen/Gefäß) in die Lösung des Kalzium-Assays mit der folgenden Zusammensetzung transferiert (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1,5 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5 Glukose und 10 HEPES, PH 7,4 mit NaOH eingestellt, einschließlich 2,5 mM Coelenterazin, das intermediäre Substrat von Aequorin, und bei 37°C für 6 h inkubiert. Das System zur Lumineszenz-Messung bestand aus dem Spektrofluorometer CAF-110 (Jasco) (Hakamata Y. et al., FEBS Lett. 352, (1994), 206–210), das mit einer Lumineszenz-Einheit PL-03 (Jasco) verbunden ist. Die Mobilisierung intrazellulären Kalziums wurde durch Injection von Koffein in einer Endkonzentration von 10 mM und Ryanodinrezeptor von 100 mM induziert. Die Gesamtmenge der Aequorin-Aktivität wurde nach der Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin in einer Endkonzentration von 200 mg/ml gemessen. Die Ethanolkonzentration betrug 0,5% oder weniger, da es unter diesen Bedingungen nicht zu einer Kalziumfreisetzung kommt.

Legenden zu den Figuren

Fig. 1 vergleicht die Aminosäuresequenzen der RyR-Isoformen, durch Ausrichtung der abgeleiteten Aminosäuresequenz des humanen RyR3 (oben), mit dem Kaninchen-RyR3 (obere Mitte), dem Kaninchen-RyR2 (untere Mitte) und dem Kaninchen-RyR1 (unten). Vier identische Reste in der gleichen Position sind durch durchgezogene Linien eingeraht, während Folgen von vier identischen oder konservierten Resten mit gestrichelten Linien umrahmt sind. Die Aminosäurereste sind, angefangen am initiierten Methionin, nummeriert. Die mutmaßlichen Transmembransegmente M1 bis M4 sind gekennzeichnet; die Enden eines jeden Segments sind durch den Vergleich mit dem Kaninchen-RyR3 bestimmt worden. Vier sich wiederholende Sequenzen, die in Tandempaaen vorkommen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Fig. 2 zeigt die Reaktion des chimären humanen RyR3 in dyspedischen Myotuben aus RyR1-defizienten (despedischen) Mäusen auf Koffein. A, Schematische Darstellung der Struktur des chimären RyR aus Kaninchen-RyR2 (offenes Rechteck) und humanem RyR3 (gefülltes Rechteck).

B, Intrazelluläres Kalziumsignal als Reaktion auf Koffein in dyspedischen Myotuben, die den chimären humanen RyR3 exprimieren. (a) Nicht-injizierte dyspedische Myotuben reagieren nicht auf 1 mM Koffein ($n = 20$). (b) Dyspedische Myotuben, in die chimäre humane RyR3-cDNA injiziert wurde, reagieren auf 1 mM Koffein ($n = 5$ von 20). Der Verlauf der Basislinie wurde möglicherweise durch das Ausbleichen des Farbstoffs hervorgerufen.

Fig. 3 zeigt die Verteilung des humanen RyR3 in humanem Gehirn durch die Northern-Blot-Analyse verschiedener Regionen des Gehirns mit cDNA-Proben für humane RyR3-mRNAs. Es wurden jeweils 2 mg poly(A)⁺RNA verwendet. Die Autoradiographie wurde bei -70°C über 7 Tage mit einem intensivierenden Schirm durchgeführt.

Fig. 4 zeigt die Expressierung von humanem RyR3 durch die Northern-Blot-Analyse verschiedener humaner Gewebe mit cDNA-Proben für humane RyR3-mRNAs. Es wurden jeweils 2 mg poly(A)⁺ RNA verwendet. Die Autoradiographie wurde bei -70°C über 7 Tage mit einem intensivierenden Schirm durchgeführt.

Fig. 5 zeigt die Verteilung des humanen RyR3 in humanen Zelllinien durch die Northern-Blot-Analyse der humanen RyR-mRNA Expression in Kaninchenskelettmuskel, Kaninchenherz, Kaninchengesamtgehirn und humanen Zelllinien wie Neuroblastoma (SK-N-MC, IMR-32), Lungenfibroblasten (HEL-299), Neuroglioma (H4), Neuroblastoma (SK-N-SH), embryonale Nierenzellen (HEK293) und Astrocytoma (U373) mit cDNA-Sonden für humane RyR3-mRNAs. Es wurden jeweils 20 mg Gesamt-RNA verwendet. Die Autoradiographie wurde bei -70°C über 4 Tage mit einem intensivierenden Schirm durchgeführt.

Fig. 6 zeigt die Zunahme von intrazellulärem Kalzium in U373-Zellen nach Zugabe von Koffein und Ryanodin. A: CHO-Zellen transfiziert mit Kaninchen RyR2-cDNA; (Maeda, A. et al., Anal. Biochem. 242, (1996), 58–66) zeigen einen klaren Anstieg des intracellulären Kalzium als Reaktion auf Koffein ($n = 11$ von 11). B: Koffein führt zu keinem Effekt in U373-Zellen ($n = 7$). C: Ryanodin löst vorübergehende Kalziumschwankungen aus ($n = 2$ out of 4). Einige Zellen reagieren nicht auf die Ryanodin-Zugabe ($n = 2$ out of 4). Die uneinheitliche Reaktion ist wahrscheinlich nicht darauf zurückzuführen, daß der Ryanodin-Rezeptor den Wirkort nicht erreicht, wie kürzlich beschrieben (Penner, R. et al., FEBS Lett. 259, (1989), 217–221). Der Zeitpunkt der Zugabe von Koffein und Ryanodin-Rezeptor ist durch kleine Balken markiert.

Fig. 7 zeigt die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz der humanen Ryanodinrezeptors.

Fig. 8 zeigt die DNA-Sequenz des humanen Ryanodinrezeptors.

Patentansprüche

1. Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, daß es mindestens 96% Aminosäuresequenzidentität mit dem humanen

Ryanodinrezeptor vom Typ 3 (hRyR3) mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 7 aufweist, wobei Fig. 7 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

2. Polypeptid, gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um den humanen Ryanodinrezeptor vom Typ 3 (hRyR3) mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 7 handelt, wobei Fig. 7 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

3. Ein funktionelles Derivat, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einem Polypeptid gemäß Anspruch 1 oder 2 als Fragment, Variante oder chemisches Derivat abgeleitet ist unter Erhalt der wesentlichen biologischen Aktivität des nativen humanen Ryanodinrezeptors vom Typ 3 (hRyR3) mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 7, wobei Fig. 7 Bestandteil dieses Anspruchs ist.

4. Chimäres Polypeptid dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Fragment des Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und mindestens ein weiteres Fragment eines anderen Polypeptids enthält.

5. Chimäres Polypeptid gemäß Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, daß das andere Protein aus der Familie der nicht humanen Ryanodinrezeptoren ausgewählt ist.

6. Chimäres Polypeptid gemäß Anspruch 4 oder 5 dadurch gekennzeichnet, daß das Fragment des anderen Proteins vom Kaninchen-Ryanodin-Rezeptor Typ 2 (rRyR2) stammt.

7. Chimäres Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß es im Bereich der Aminosäure 1300 des hRyR3 ein Fragment des rRyR2 enthält, welches hohe Kalzium- bzw. Koffeinempfindlichkeit verleiht.

8. Nukleinsäure kodierend für ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

9. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie unter stringenten Bedingungen mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 hybridisiert.

10. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 oder 9 in eine Zelle oder ein zellfreies In-Vitro-Translations-System eingebracht wird.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Bestandteil eines Expressionsvektors ist.

12. Pharmazeutikum, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 oder 9 enthält.

13. Pharmazeutikum, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäure die einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 oder 9 komplementär ist enthält.

14. Verwendung einer Nukleinsäure oder eines Teils einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 oder 9 zum Nachweis einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine zu der nachzuweisenden Nukleinsäure komplementäre Nukleinsäure zur Hybridisierung eingesetzt wird.

15. Verwendung eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung monoklonaler oder polyclonaler Antikörper zum Nachweis eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

16. Verwendung der Polypeptide gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 8 oder 9 zur Identifizierung von Aktivatoren und/oder Inhibitoren des hRyR3.

17. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 zur Identifizierung von Aktivatoren und/oder Inhibitoren des hRyR3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 in eine Zelle oder ein zellfreies System eingebracht und exprimiert wird, das Expressionsprodukt einem potentiellen Inhibitor oder Aktivator ausgesetzt wird und der durch das Expressionsprodukt vermittelte Ionenfluß gemessen wird.

18. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 zur Identifizierung von Aktivatoren und/oder Inhibitoren des hRyR3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 in eine Zelle oder ein membranumschlossenes zellfreies System eingebracht und exprimiert wird, ein potentieller Inhibitor oder Aktivator zuge-
setzt wird und die Ionenkonzentration im membranumschlossenen Raum bestimmt wird.

19. Verwendung eines Antikörpers gemäß Anspruch 15 zur Diagnose von pathologischen Zuständen in Geweben, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein, die Überexpression oder der Mangel eines Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 nachgewiesen wird.

20. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 14 zur Diagnose von pathologischen Zuständen in Geweben, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein, die Überexpression oder der Mangel einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9 nachgewiesen wird.

21. Verwendung der Polypeptide gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 und/oder Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 9 zur Behandlung von hRyR3 assoziierten Erkrankungen.

Hierzu 18 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

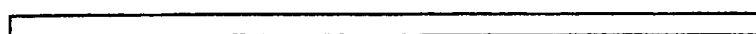
Fig. 1a

[illegible]

NR01 2708-2822
NR02 2710-2822
NR03 2712-2822
NR04 2714-2822
NR05 2716-2822
NR06 2718-2822
NR07 2720-2822
NR08 2722-2822
NR09 2724-2822
NR10 2726-2822
NR11 2728-2822
NR12 2730-2822
NR13 2732-2822
NR14 2734-2822
NR15 2736-2822
NR16 2738-2822
NR17 2740-2822
NR18 2742-2822
NR19 2744-2822
NR20 2746-2822
NR21 2748-2822
NR22 2750-2822
NR23 2752-2822
NR24 2754-2822
NR25 2756-2822
NR26 2758-2822
NR27 2760-2822
NR28 2762-2822
NR29 2764-2822
NR30 2766-2822
NR31 2768-2822
NR32 2770-2822
NR33 2772-2822
NR34 2774-2822
NR35 2776-2822
NR36 2778-2822
NR37 2780-2822
NR38 2782-2822
NR39 2784-2822
NR40 2786-2822
NR41 2788-2822
NR42 2790-2822
NR43 2792-2822
NR44 2794-2822
NR45 2796-2822
NR46 2798-2822
NR47 2800-2822
NR48 2802-2822
NR49 2804-2822
NR50 2806-2822
NR51 2808-2822
NR52 2810-2822
NR53 2812-2822
NR54 2814-2822
NR55 2816-2822
NR56 2818-2822
NR57 2820-2822
NR58 2822-2822
NR59 2824-2822
NR60 2826-2822
NR61 2828-2822
NR62 2830-2822
NR63 2832-2822
NR64 2834-2822
NR65 2836-2822
NR66 2838-2822
NR67 2840-2822
NR68 2842-2822
NR69 2844-2822
NR70 2846-2822
NR71 2848-2822
NR72 2850-2822
NR73 2852-2822
NR74 2854-2822
NR75 2856-2822
NR76 2858-2822
NR77 2860-2822
NR78 2862-2822
NR79 2864-2822
NR80 2866-2822
NR81 2868-2822
NR82 2870-2822
NR83 2872-2822
NR84 2874-2822
NR85 2876-2822
NR86 2878-2822
NR87 2880-2822
NR88 2882-2822
NR89 2884-2822
NR90 2886-2822
NR91 2888-2822
NR92 2890-2822
NR93 2892-2822
NR94 2894-2822
NR95 2896-2822
NR96 2898-2822
NR97 2900-2822
NR98 2902-2822
NR99 2904-2822
NR00 2906-2822

Fig. 2

A



Rabbit RyR2



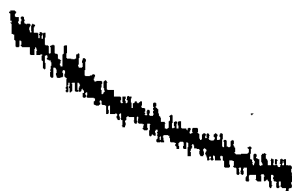
Chimeric RyR



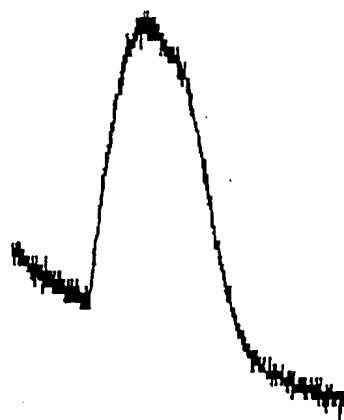
Human RyR3

B

a



b



ΔF

5 s

Fig. 3

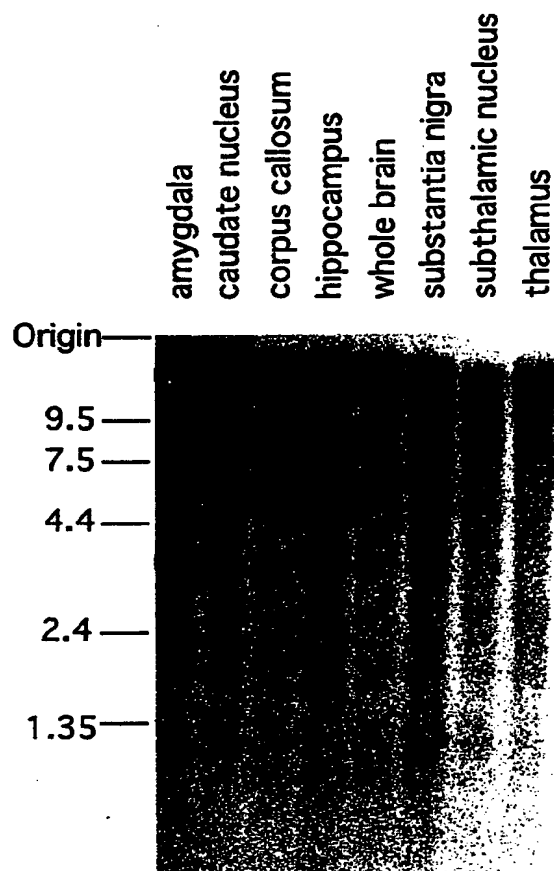


Fig. 4

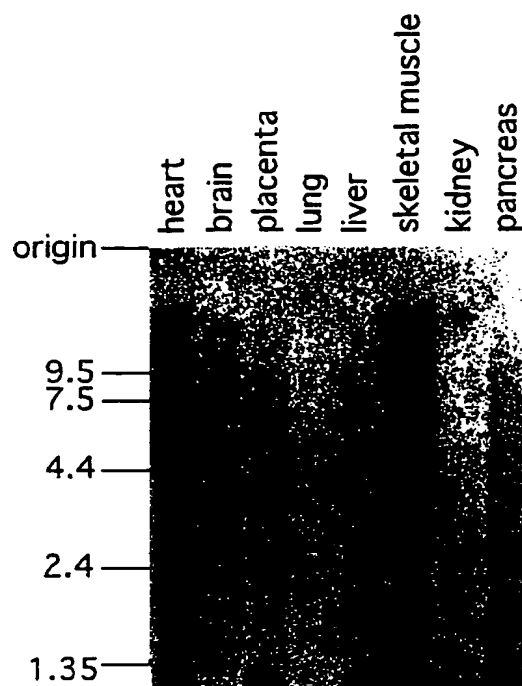
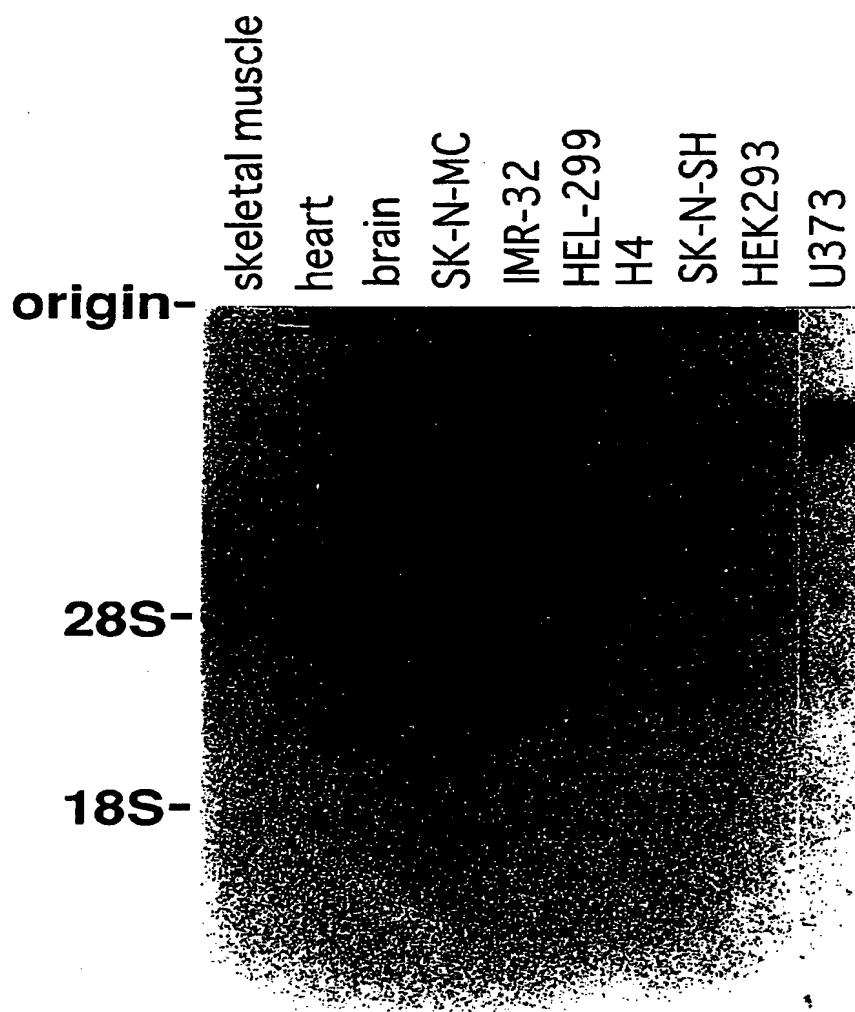


Fig. 5



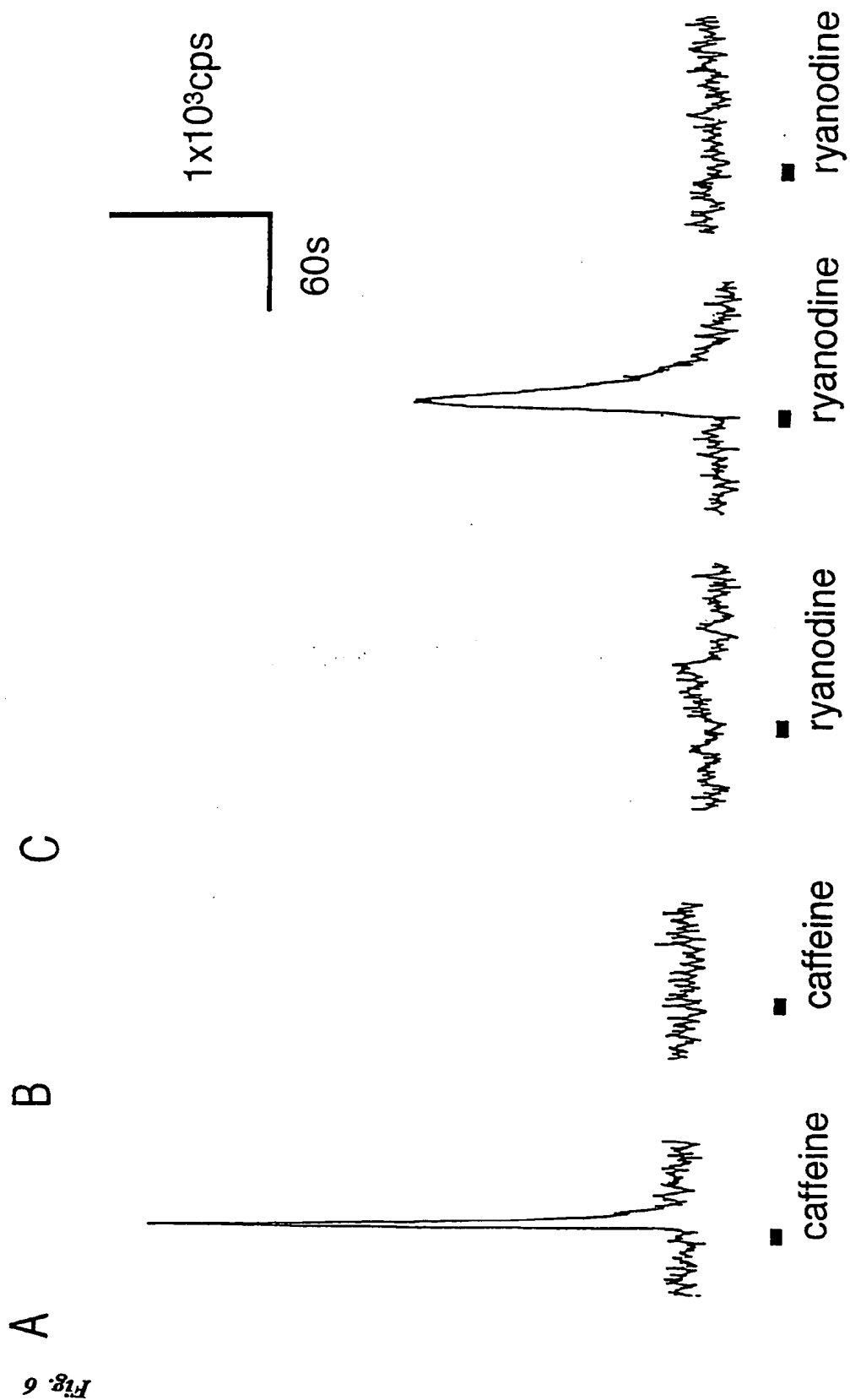


Fig. 7a

MAEGGEGGED	EIQFLRTEDE	VVLQCIATIH	KEQRKFCLAA	EGLGNRLCFL	EPTSEAKYIP	60
PDLVCVNFVL	EQSLSVRALQ	EMLANTGENG	GEGAAQGGGH	RTLLYGHAVL	LRHSFSGMYL	120
TCLTTSRSQT	DKLAFDVGLR	EHATGEACWW	TIHPASKQRS	EGEKVRIGDD	LILSVSSSER	180
YLHLSVSNGN	IQVDASFMT	LWNVHPTCSG	SSIEEGYLLG	GHVVRLFHGH	DECLTIPSTD	240
QND SQHRRIF	YEAGGAGTRA	RSLWRVEPLR	ISWGSNIRW	GQAFRLRHLT	TGHYLA/TED	300
QGLILQDRAK	SDTKSTAFSF	RASKELKEKL	DSSHKRDIEG	MGVPEIKYGD	SVCFVQHIAS	360
GLWVTYKAQD	AKTSRLGPLK	RKVILHQEGH	MDDGLTLQRC	QREESQAARI	IRNTTALFSQ	420
FVSGNNRTAA	PITLPIEEVL	QTLQDLIAYF	QPPEEEMRHE	DKQNKLRSLK	NRQNLFKEEG	480
MLALVLNCID	RLNVYNSVAH	FAGIAREESG	MAWKEILNLL	YKLLAALIRG	NRNNCAQFSN	540
NLDWLISKLD	RLESSSGILE	VLHCILTESP	EALNLIABGH	IKSIISLLDK	HGRNHKVLDI	600
LCSLCLCNGV	AVRANQNLIC	DNLLPRRNL	LQTRLINDVT	SIRPNIFLGV	AEGSAQYKKW	660
YFELIIDQVD	PFLTAEPTHL	RVGWASSSGY	APYPGGGEGW	GGNGVGDDLY	SYGFDGLHLW	720
SGRIPRAVAS	INQHLLRSDD	VGKLLPGPRG	CPASHSASMG	SPCRGCLENF	NTDGLFFPVM	780
SFSAGVKVRF	LMGGRHGEFK	FLPPSGYAPC	YEALLPEKEM	RLEFVKEYKR	DADGIRDLLG	840
TTQFLSQASF	IPCFVDTSQV	ILPPHLEKIR	DRLAENIHEL	WGMNKIELGW	TFGKIRDDNK	900
RQHPCLVEFS	KLPETEKNYN	LQMSTETLKT	LLTLGCHIAH	VNPAAEEDLK	KVKLPKNYMM	960
SNGYKPAPLD	LSDVKLLPPQ	EILVDKLAEN	AHNWAKDRI	KQGWTYGIQQ	DLKNKRNPR	1020
VPYALLDERT	KKSNRDSLRE	AVRTFVGYYG	NIEPSDQELA	DSAVEKVSID	KIRFFRVERS	1080
YFVRSGKWYF	EFEVVTGGDM	RVGWARPGCR	PDVELGADDQ	AFVFEGNRGQ	RWHQSGGYFG	1140
RTWQPGDVVG	CMINLDDASM	IFTLNGELLI	TNKGSELAF	DYEIENGFP	ICCLGLSQIG	1200
RMNLGTDAST	FKFYTMGLQ	EGFEPFAVNM	NRDVAMWFSK	RLPTFVNVPK	DHPHIEVMRI	1260
DGTMDSPPC	KVTHKTFGTQ	NSNADMIYCR	LSMPVECHSS	FSHSPCLDSE	AFQKRKQMQE	1320
ILSHTTTQCY	YAIRIFGGQD	PSCVWVGWVT	PDYHLYSEKF	DLNKNCTVTV	TLGDERGRVH	1380
ESVKRSNCYM	VWGGDIVASS	QRSNRSNVDL	EIGCLVDLAM	GMLSFSANGK	ELGTCYQVEP	1440
NTKVFPVAVL	QPTSTSLFQF	ELGKLKNAMP	LSAAIFRSEE	ENFVPQCPPR	LDVQTIQFVL	1500
WSRMPNSFLK	VETERVSERH	GWVVQCLEPL	QMMALHIPEE	NRCVDILELC	EQEDLMRFHY	1560
HTLRLYSAVC	ALGNSRVAYA	LCSHVDLSQL	FYAIDNKYLP	GLLRSGFYDL	LISIHLASAK	1620
ERKLMMKNEY	IIPITSTTRN	ICLFPDESKR	HGLPGVGLRT	CLKPGFRFST	PCFVVTGEDH	1680
QKQSPPEIP	SLRTKALSML	TEAVQCSGAH	IRDPVGGSV	FQFVPVLKLI	GTLLVMGVFD	1740
DDDVQRILL	IDPSVFGEHS	AGTEEGAEKE	EVTQVEEKAV	EAGEKAGKEA	PVKGLLQTRL	1800
PESVKLQMC	LLSYLCDCEL	QHRVEAIVAF	GDIYVSKLQA	NQKFRYNELM	QALNMSAALT	1860
ARKTKEFRSP	PQEQINMLLN	FQLGENCPCP	EEIREELYDF	HEDLLLHCGV	PLEEEEEEEEE	1920

Fig. 7a

DTSWTGKLCA	LVYKIRGPPK	PEKEQPTTEE	ERCPTTLKEL	ISQTMICWAQ	EDQIQDSELV	1980
RMMFNLLRRQ	YDSIGELLQA	LRKTYTISHT	SVSDTINLLA	ALGQIRSLLS	VRMGKEEELL	2040
MINGLGDIMN	NKVFYQHPL	MRLVGMHETV	MEVMVNLGT	EKSQIAFPKM	VASCCRFLCY	2100
FCRISRQNK	AMFEHLSYLL	ENSSVGLASP	SMRGSTPLDV	AASSVMDNNE	LALSLEEPDL	2160
EKVVTYLAGC	GLQSCPMLLA	KGYPDVGNP	IEGERYLSFL	RFAVFNSES	VEENASVVVK	2220
LLIRPECFG	PALRGEGNG	LLAAMQGAIK	ISENPALDLP	SQGYKREVST	EDDEEEETV	2280
HMGNAIMSFY	SALIDLLGRC	APEMHLIQTG	KGEAIRIRSI	LRSLVPTEDL	VGIISIPKL	2340
PSLNKDGVS	EPDMAGNFCP	DHKAPMVLFL	DRVYGIKQDT	FLLHLLVGF	LPDLRASASL	2400
DTVSLSTTEA	ALALNRYICS	AVLPLLTRCA	PLFGGTEHCT	SLIDSTLQTI	YRLSKGRSLT	2460
KAQRTTIEEC	LLAICNHLRP	SMLQQLLRRL	VFDVPQLNEY	CKMPLKLLTN	HYEQCWKYC	2520
LPSGWGSYGL	AVEEELHTE	KLFWGIIDSL	SHKRYDPDLF	RMALPCLSAI	AGALPPDYLD	2580
SRITATLEKQ	ISVDADGNFD	PKPINIMNFS	LPEKLEYIVT	KYAEHSHDKW	ACDKSQSGWK	2640
YGISLDENVK	THPLIRPFKT	LTEKEKEIYR	WPARESLKTM	LAVGWTVERT	KEGEALVQQR	2700
ENEKLRVSQ	ANQGNYSIPA	PLDLSNVVLS	RELQGMVEV	AENYHNIWAK	KKKLELESKG	2760
GGSHPLLVFY	DTLTAKEKFK	DREKAQDLFK	FLQVNGIIVS	RGKDMELDA	SSMEKRFQYK	2820
FLKKILKYVD	SAQEFIAHLE	AIVSSGKTEK	SPRDQEIKFF	AKVLLPLVDQ	YFTSHCLYFL	2880
SSPLKPLSSS	GYASHKEKEM	VAGLFCKLAA	LVRHRISLFG	SDSTTMVSCL	HILAQTLDT	2940
TVMKSGSELV	KAGLRAFFEN	AAEDLEKTSE	NLKLKGKFTS	RTQIKGVSON	INYTTVALLP	3000
ILTSIFEHVT	QHQQFGMDLL	GDVQISCYHI	LCSLYSLGTG	KNTYVERQRP	ALGECLASLA	3060
AAIPVAFLEP	TLNRYNPLSV	FNTKTPRERS	ILGMPDITVED	MCPDIPQLEG	LMKEINDLAE	3120
SGARYTEMPH	VIEVILPMLC	NYLSYWWERG	PENLPPSTGP	CCTKVTSEHL	SLILGNILKI	3180
INNNLGIDEA	SWMKRIAVYA	QPIISKARPD	LLRSHFIPTL	EKLKKKAVKT	VQEEELKAD	3240
GKGDTOEAE	LILDEFVLC	RDLYAFYPM	IRYVDNRSN	WLKSPDADSD	QLFRMVAEVF	3300
ILWCKSHNFK	REEQNFIQON	EINNLAFITG	DSKSKMSKSG	GQDQERKTK	RRGDLYSIQT	3360
SLIVAALKKM	LPIGLNMCTP	GDQELISLAK	SRYSRDTDE	EVREHLRNNL	HLQESDDPA	3420
VKWQLNLYKD	VLKSEEPFNP	EKTVERVQRI	SAAVFHLEQV	EQPLRSKAV	WHKLLSKQK	3480
RAVVACFRMA	PLYNLPRHRS	INLFLHGYQR	FWIETEEYSF	EEKLVQDLAK	SPKVEEEEEE	3540
ETEKQPDPLH	QIILYFSRNA	LTERSKLEDD	PLYTSYSSMM	AKSCQSGEDE	EEDDKKTKT	3600
EEKEMEKKQT	LYQQARLHER	GAAEMVLQMI	SASKGEMSPM	VVETLKLGLA	ILNGGNAGVQ	3660
QKMLDYLKEK	KDAGFFQSLP	GLMQSCSVLD	LNASERQNK	EGLGMVTEEG	TLIVRERGEK	3720
VLQNDFTTRD	LFRFLQLLCE	GHNSDFQNFL	RTQMGNTTIV	NVIISTVDYL	LRLQESISDF	3780
YWYYSKDI	DESGQHNFSK	ALAVTKQIFN	SLTEYIQGPC	IGNQQSLAHS	RLWDAVVGFL	3840
HVFANMQMKL	SQDSSQIELL	KELLDLLQDM	VMLLSLLEG	NVNGTIGKQ	MVDTLVESST	3900
NVEMILKFFD	MFLKLKDLTS	SDTFKEYDPD	GKGIISKKEF	QKAMEGQKQY	TQSEIDFLLS	3960

Fig. 7c.

CAEADENDMF	NYVDFVDRFH	EPAKDIGFNV	AVLLTNLSEH	MPNDSRLKCL	LDPAESVLNY	4020
FGPYLGRIEI	MGGAKKIERV	YFEISESSRT	QWEKPQVKES	KRQFIFDVVN	EGGEQEKMGL	4080
FVNFCEDTIF	EMQLASQISE	SDSADRPEEE	EEDEDSSYVL	EIAGEEEEEDG	SLEPASAFAM	4140
ACASVKRNV	DFLKTRATLKN	LRKQYRNVKK	MTAKELVKVL	FSFFWMLFVG	LFQLLFTILG	4200
GIFQILWSTV	FGGGLVEGAK	NIRVTIKILGD	MPDPTQFGIH	DDIMEAERAE	VMEPGITTEL	4260
VHFIKGEKGD	TDIMSDLFGL	HPKKEGSLKH	GPEVGLGDLS	EIIGKDEPPT	LESTVQKKRK	4320
AQAAEMKAAN	EAEGKVESEK	ADMEDGEKED	KDKEEQAEY	LWTEVTKKKK	RRCGQKVEKP	4380
EAF TANFFKG	LEIYQTKLLH	YLARNFYNL	FLALFVAFAI	NFILLFYKVT	EEPLEEETED	4440
VANLWNSFND	EEEEEEAMVFF	VLQESTGYMA	PTLRALAIH	TIISLVCVVG	YYCLKVPLVV	4500
FKREKEIARK	LEFDGLYTE	QPSEDDIKQ	WDPLVINTPS	FPNNYWDKfV	KRKVINKYGD	4560
LYGAERIAEL	LGLDKNALDF	SPVEETKAEA	ASLVSWLSSL	DMKYHIWKL	GVFTDNSFLY	4620
LAWYTIMSVL	GHYNNFFFAA	HLLDIAMGFK	TLRTILSSVT	HNGKQLVLT	VGLAVVVVLY	4680
TVVAFNFFRK	FYNKSEDDDE	PDMKCDDMT	CYLFHMYGV	RAGGGIGDEI	EDPAGDPYEM	4740
YRIVFDITFF	FFVIVILLAI	IQGLIIDAFG	ELRDQQEQVR	EDMETKCFIC	GIGNDYFDTT	4800
PHGFETHTLQ	EHNLANYLFF	LMYLINKDET	EHTGQESYVW	KMYQERCWDF	FPAGDCFRKQ	4860
YEDQLG						

Fig. 8a

```

GGGCAGCAGC AGTCAGCGCA CGCCGAGCGG CTGCCGGGGG AAGCAGAGGC GCCGGAGGCT      60
GGGGCACCGC CGACGCCTCG GGAGCCATGG CCGAAGGGGG AGAAGGAGGC GAGGACGAGA      120
TCCAGTTTCT GAGGACTGAG GATGAAGTGG TACTCCAGTG CATCGCCACC ATTCATAAGG      180
AGCAGAGGAA GTTCTGCCTG GCAGCCGAGG GACTTGGGAA TCGCCTGTGC TTCTTGGAAC      240
CCACTTCAGA AGCCAAGTAC ATTCTCCAG ATCTCTGCGT CTGCAATTTT GTGCTGGAAC      300
AGTCCCTATC TGTCAGAGCC CTGCAGGAAA TGCTTGCCAA CACAGGTGAA AATGGCGGCG      360
AAGGGGCAGC ACAAGGAGGT GGCCACAGGA CCCTGTTATA CGGCCATGCA GTTCTCTCTGA      420
GGCACTCTTT CAGCGGAATG TATCTAACAT GCTTGACTAC ATCAAGATCC CAGACAGACA      480
AATGTGCCTT TGATGTAGGT CTACGGGAAC ATGCCACAGG AGAAGCCTGT TGGTGGACTA      540
TACATCCTGC TTCCAAACAG AGGTCCGAAG GAGAGAAAGT TCGAATTGGC GATGACCTCA      600
TCCTCGTCAG CGTGTCTCTT GAAAGATACC TTCATCTCTC AGTATCAAAT GGTAACATAC      660
AAGTGGATGC CTCCTTTATG CAAACACTCT GGAATGTACA TCCTACGTGC TCAGGAAGTA      720
GCATCGAAGA AGGATACCTA CTGGGTGGGC ATGTAGTACG TCTTTTCCAT GGTTCATGATG      780
AATGTTTGAC GATACCATCT ACAGACCAGA ATGATTCCCA GCACAGGAGG ATATTCTACG      840
AAGCTGGGGG AGCTGGGACT CGAGCCAGGT CTCFTTGGAG AGTGAACCC CTTGGGATAA      900
GCTGGAGTGG CAGTAACATC AGATGGGGCC AGGCTTTCCG ACTCCGGCAT CTCACCACAG      960
GCCACTACCT GGCCTTGACA GAAGACCAAG GCCTTATACT GCAAGACCGG GCAAAGTCAG     1020
ACACCAAGTC CACAGCTTTC TCTTTCCGGG CATCAAAGGA ACTCAAGGAG AAATTAGACT     1080
CCAGTCACAA GCGAGACATA GAAGGCATGG GAGTCCAGA AATCAAGTAT GGAGATTCTG     1140
TCTGCTTTGT GCAGCATATA GCCAGTGGTC TGTGGGTGAC CTACAAAGCA CAAGACGCCA     1200
AAACTTCCCG CCTGGGACCT CTAAAAAGAA AGGTCATACT CCATCAGGAA GGCCACATGG     1260
ATGATGGATT AACACTGCAG AGATGCCAAC GTGAGGAGTC CCAGGCTGCT CGGATCATCC     1320
GGAACACTAC AGCCTTATTC AGCCAGTTTG TCAGTGAAA CAATCGACA GCTGCCCCCA     1380
TCACCCTGCC TATAGAAGAA GTCCTGCAGA CCCTACAGGA CTTGATCGCC TACTTCCAGC     1440
CCCCAGAGGA GGAGATGCGA CATGAAGACA AGCAGAACAA GCTCCGCTCA CTCAAAAACA     1500
GACAAAATCT TTTCAAGGAA GAGGGAATGT TGGCCCTTGT CTTAAATTGC ATTGACCGCT     1560
TAAATGTCTA CAATAGCGTA GCACACTTTG CAGGGATTGC AAGGGAAGAG AGTGGCATGG     1620
CCTGGAAAGA AATTCTGAAC CTCCTCTACA AATTGCTGGC TGCTCTCATT CGCGGAAACA     1680
GAAACAATTG CGCTCAATTC TCCAATAACC TTGATTGGCT CATCAGTAAA TTGGACAGAC     1740
TAGAATCTTC CTCAGGTATC TTGGAAGTTT TGCACTGCAT CTTAACTGAA AGOCCAGAAG     1800
CCTTAAATCT GATAGCGGAG GGCCACATCA AGTCGATCAT CTCCCTGTTG GATAAGCACG     1860
GGCGGAATCA CAAGGTCTCT GATATCCTGT GCTCCCTCTG TCTCTGCAAT GGGGTTGCAG     1920

```

Fig. 8b.

TGAGAGCCAA	CCAGAATCTG	ATCTGTGACA	ACTTGCTGCC	CCGGAGAAAC	CTACTCCTGC	1980
AGACACGACT	GATTAAACGAT	GTAACCAGTA	TCCGGCCAAA	CATCTTCTCTG	GGAGTCGCGG	2040
AGGGCTCAGC	CCAGTACAAG	AAGTGGTACT	TCGAGCTGAT	TATCGACCAG	GTGGACCCCT	2100
TCCTAACAGC	AGAGCCCACA	CATCTGCGGG	TGGGCTGGGC	CTCTTCTTCA	GGCTATGCCC	2160
CATACCCAGG	AGGTGGAGAA	GGATGGGGAG	GCAATGGTGT	TGGTGACGAC	CTGTACTCCT	2220
ATGGCTTTGA	TGGACTTCAC	CTTTGGTCAG	GCCGGATACC	CAGAGCTGTG	GCTTCCATCA	2280
ACCAGCACCT	CCTGAGATCG	GATGACGTGG	GTAAGCTGCT	GCCTGGACCT	CGGGGGTGCC	2340
CAGCATCTCA	TTCCGCATCA	ATGGGCAGCC	CGTGCAGGGG	ATGTTTGGAG	AACTTCAACA	2400
CAGACGGGCT	CTTCTTCCCT	GTGATGAGCT	TTTCAGCAGG	TGTCAAAGTA	CGTTTCTGA	2460
TGGGTGGACG	TCATGGAGAG	TTTAAGTTCC	TGCCTCCCTC	TGGCTATGCC	CCTTGCTATG	2520
AAGCCTTACT	TCCAAAAGAG	AAGATGAGAT	TGGAGCCTGT	CAAAGAATAT	AAACGTGATG	2580
CTGATGGCAT	TAGAGATCTC	TTGGGTACCA	CCCAGTTCCCT	CTCCCAAGCC	TCTTTCATCC	2640
CATGCCCCGT	AGACACCAGT	CAGGTTATTT	TGCCACCTCA	CCTAGAAAAG	ATCCGAGACA	2700
GACTAGCTGA	AAACATCCAT	GAGCTTTGGG	GAATGAATAA	AATAGAACTT	GGCTGGACTT	2760
TCGGCAAGAT	ACGAGATGAC	AATAAAAGAC	AACACCCTTG	CCTTGTGGAG	TTTTCAAAGC	2820
TCCCAGAAAC	TGAGAAGAAC	TATAACCTGC	AAATGTCAAC	TGAAACCTTA	AAAACCCCTCT	2880
TGACCCTGGG	TTGCCACATT	GCTCATGTTA	ACCCAGCTGC	TGAGGAGGAT	CTCAAGAAGG	2940
TCAAAC TGCC	CAAAAAC TAT	ATGATGTCCA	ACGGCTATAA	GCCAGCCCCT	TTGGATTGTG	3000
CTGATGTGAA	GCTGTTACCT	CCTCAAGAAA	TTTATAGTGA	TAAGCTTGCA	GAAAAATGCAC	3060
ACAATGTTTG	GGCAAAAGAC	AGAATAAAAC	AAGGATGGAC	CTATGGCATC	CAACAGGATT	3120
TGAAGAACAA	AAGAAATCCC	CGTCTGGTGC	CATATGCATT	ACTGGATGAG	CGTACCAAGA	3180
AGTCAAACAG	GGACAGCCTG	CGGGAAGCTG	TGCGCACTTT	TGTTGGTTAC	GGGTATAACA	3240
TTGAGCCATC	AGACCAAGAA	CTAGCTGACT	CGCTGTGGA	GAAGGTGAGC	ATAGACAAGA	3300
TCCGATTTTT	CCGGGTAGAG	CGATCTTATC	CAGTGAGATC	TGGAAAGTGG	TATTTTGTAGT	3360
TTGAAGTGGT	GACTGGAGGA	GACATGCGAG	TCGGCTGGGC	GAGGCCAGGC	TGTCGACCTG	3420
ATGTCGAGCT	GGGGGCCGAT	GACCAAGCCT	TTGTGTTTGA	AGGCAACAGG	GGCCAGCGTT	3480
GGCATCAAGG	AAGTGGGTAT	TTTGGGCGTA	CCTGGCAGCC	AGGGGATGTG	GTCCGATGTA	3540
TGATTAACTT	GGATGATGCT	TCAATGATCT	TCACACTGAA	TGGGGAGCTG	CTGATCACCA	3600
ACAAAGGCTC	TGAAC TTGCC	TTGCTGACT	ACGAGATTGA	GAATGGCTTC	GTGCCCATCT	3660
GCTGTCTGGG	TCTATCTCAG	ATCGGCCGCA	TGAATCTGGG	GACAGATGCC	AGTACCTTCA	3720
AGTTTTTATAC	CATGTGCGGT	CTCCAAGAGG	GCTTTGAGCC	TTTTGCTGTC	AACATGAACA	3780
GAGATGTTGC	TATGTGGTTC	AGCAAGCGCC	TCCCAGCGTT	TGTCAACGTG	CCAAGGATC	3840
ATCCACACAT	AGAGGTATG	AGGATTGATG	GCACCATGGA	CAGCCCTCCG	TGTCTCAAGG	3900
TGACGCATAA	GACATT TGGC	ACACAGAATA	GCAATGCGGA	CATGATCTAT	TGCCGCTTGA	3960

Fig. 8c

GCATGCCTGT	CGAGTGCCAC	TCCTCCTTCA	GTCACAGCCC	CTGTCTGGAC	AGTGAAGCTT	4020
TCCAGAAAAG	GAAACAGATG	CAAGAAATAC	TCTCTCATAC	AACAACACAG	TGCTACTACG	4080
CCATCCGCAT	CTTTGGTGA	CAGGATCCAT	CCTGTGTCTG	GGTCGGATGG	GTGACTCCAG	4140
ACTATCACTT	GTACAGTGAA	AAGTTTGACC	TGAATAAAAA	CTGCACAGTG	ACTGTCACCC	4200
TAGGGGATGA	AAGAGGCCGG	GTCCATGAAA	GTGTGAAACG	CAGCAACTGC	TACATGGTCT	4260
GGGTGGAGA	CATTGTAGCC	AGTTCCCAGA	GATCAAATCG	GAGCAACGTG	GACCTGGAGA	4320
TCGGCTGTCT	CGTGGATCTG	GCCATGGGCA	TGTTGTCTTT	CTCAGCCAAT	GGAAAGGAAC	4380
TGGGCACCTG	CTACCAGGTG	GAGCCTAATA	CCAAAGTGTT	TCCAGCAGTC	TTCTGCGAGC	4440
CTACAAGTAC	TTCTTTGTTT	CAGTTTGAAC	TTGGAAAGCT	GAAGAACGCA	ATGCCCTGT	4500
CAGCGGCCAT	ATTCCAGGAGT	GAAGAGGAGA	ACCCAGTCCC	ACAGTGTTCA	CCTCGGCTGG	4560
ACGTCCAAAC	CATCCAGCCC	GTGCTCTGGA	GCCGCATGCC	CAACAGCTTC	CTGAAGGTGG	4620
AGACCGAGCG	TGTGAGCGAG	CGCCACGGCT	GGGTGGTGCA	GTGCCTGGAG	CCCCTGAGA	4680
TGATGGCGCT	CCACATCCCC	GAGGAGAACA	GGTGTGTGGA	TATCCTGGAG	CTCTGTGAGC	4740
AGGAGGACCT	GATGCGGTTC	CATTACCACA	CGCTGAGGCT	CTACAGCGCG	GTGTGCGCCC	4800
TGGGAAACAG	CCGCGTGGCC	TACGCCCTGT	GCAGCCACGT	GGACCTCTCC	CAGCTCTTCT	4860
ATGCCATTGA	CAACAAGTAC	CTCCCCGGCC	TCCTTCGATC	TGGTTTCTAT	GACCTGCTCA	4920
TCAGCATCCA	CCTGGCCAGC	GCCAAGGAGA	GGAAGCTGAT	GATGAAGAAC	GAGTACATCA	4980
TCCCCATTAC	CAGCACCACC	AGGAATATCT	GCCTCTTCCC	GGACGAGTCC	AAGAGGCATG	5040
GACTGCCTGG	GGTGGGCTG	AGAACATGTC	TCAAGCCCGG	GTTTCAGGTT	TCCACCCCTT	5100
GCTTTGTTGT	GA CTGGTGAG	GATCACCAAA	AGCAGAGCCC	CGAGATTCCC	TTGGAGAGTC	5160
TCAGGACGAA	GGCTCTGAGT	ATGCTGACAG	AGGCAGTGCA	GTGCAGCGGG	GCCACATCC	5220
GAGACCCTGT	AGGGGGGTCT	GTGGAGTTCC	AGTTTGTGCC	TGTGCTGAAA	CTCATTTGAA	5280
CCCTGTCTGT	CATGGGCGTG	TTTGATGATG	ATGATGTTTG	GCAGATCCTC	CTCTGATTG	5340
ATCCCTCTGT	GTTTGGGGAG	CATAGTGGG	GGACAGAGGA	GGGAGCAGAA	AAGGAGGAAG	5400
TGACCCAGGT	GGAGGAGAAG	GCTGTGGAGG	CTGGGGAGAA	GGCCGGCAAG	GAGGCTCTTG	5460
TCAAAGGCTT	GTTGCAGACT	CGATTACCCG	AATCCGTCAA	GCTGCAGATG	TGTGAGCTCC	5520
TCAGCTATCT	CTGCGACTGT	GAGCTGCAGC	ACCGAGTGGA	GGCCATTGTG	GCATTGTTGT	5580
ACATTTATGT	CTCCAAGCTG	CAGGCAAATC	AGAAGTTCCG	CTACAATGAG	CTCATGCAGG	5640
CCCTGAACAT	GTCTGCGGCC	CTGACTGCCC	GGAAGACCAA	GGAGTTCCGC	TCACCCCCAC	5700
AGGAGCAGAT	CAACATGCTG	CTTAACCTTC	AACTGGGAGA	GAAGTGCCCC	TGCCCAGAGG	5760
AGATTGCGGA	GGAGCTGTAT	GATTTCCATG	AGGACCTTCT	CCTTCACTGT	GGGGTTCTTT	5820
TGGAAGAAGA	GGAAGAGGAG	GAGGAGGACA	CTCTCTGGAC	AGGAAAATCT	TGTGCCCTTG	5880
TTTACAAAAT	CAAAGGCCCA	CCCAAGCCAG	AGAAGGAGCA	GCCGACGGAG	GAGGAGGAGA	5940

Fig. 8d.

GATGCCCCAC AACATTGAAG GAACTCATCT CACAGACGAT GATCTGCTGG GCCCAGGAGG 6000
 ACCAGATCCA GGATTCAGAG CTGGTCCGAA TGATGTTCAA CCTCCTCCGG AGGCAGTATG 6060
 ACAGCATTGG GGAGCTGCTG CAGGCGCTGC GGAAGACCTA CACCATCAGC CACACCTCTG 6120
 TAAGCGACAC CATCAACCTG CTGGCTGCCC TGGGCCAAAT CCGCTCCCTC CTCAGTGTCA 6180
 GGATGGGCAA GGAAGAGGAG TTGCTCATGA TCAATGGGCT GGGAGACATA ATGAACAACA 6240
 AGGTGTTTTA CCAGCATCCC AACCTCATGA GAGTCTGGG CATGCACGAG ACGGTGATGG 6300
 AGGTGATGGT GAACGTGTTG GGTACAGAGA AATCTCAGAT TGCATTTCCA AAGATGGTTG 6360
 CTAGCTGCTG CCGTTTCCTT TGCTATTTCT GTCGAATTAG CCGGCAAAAT CAGAAGGCCA 6420
 TGTTTGAGCA TCTGAGTTAT CTTCTGGAGA ATAGCAGTGT TGGCCTAGCC TCCCCGTGCA 6480
 TGAGGGGATC CACCCCGCTG GATGTGGCAG CTTCTCTGTG GATGGACAAC AATGAGTTAG 6540
 CGCTGAGCTT AGAGGAACCA GACCTCGAGA AGGTGGTGAC CTACTTGGCA GGCTGTGGCC 6600
 TACAGAGCTG CCCCATGCTT CTGGCCAAAG GATACCTGA TGTCGGCTGG AACCCCATG 6660
 AAGGGGAACG CTACCTGTCC TTCCTGAGGT TTGCTGTCTT CGTGAACAGT GAGAGTGTGG 6720
 AAGAAAACGC CAGCGTTGTG GTCAAGCTGC TCATCAGACG CCCAGAGTGC TTCGGCCCGG 6780
 CCCTGCGGGG TGAGGGGGGA AACGGACTCT TGGCAGCCAT GCAGGGTGCC ATTAAGATCT 6840
 CTGAGAACCC AGCGCTCGAC CTCCCTCTC AAGGATACAA AAGAGAAGTC AGCACGGAGG 6900
 ACGATGAAGA GGAAGAAGAA ATCGTGCATA TGGGCAATGC AATTATGTCA TTTTATTCGG 6960
 CCCTTATAGA TCTACTGGGC CGCTGTGCTC CTGAAATGCA CCTCATCCAG ACAGGAAAGG 7020
 GGGAAAGCCAT CCGCATCAGG TCCATCCTGC GCTCCCTGGT CCCCACAGAA GACCTGGTTG 7080
 GGATCATCAG CATCCCTTG AACTGCCCCT CCTCAACAA AGATGGGTG GTGAGTGAGC 7140
 CAGATATGGC GGGCAATTTT TGCCCTGACC ACAAGGCACC TATGGTGCTG TTCCTGGACC 7200
 GCGTTTATGG CATTAAGGAT CAAACTTTTC TGCTCCACTT GCTGGAGGTT GGATTTTTCAC 7260
 CTGACCTAAG AGCTTCTGCC TCTCTAGATA CAGTTTCCCT AAGCACCACA GAGGCTGCGC 7320
 TTGCACTAAA TAGGTATATA TGTTCTGCTG TGCTCCCGCT CCTCACAAGA TGTGCCCCCTC 7380
 TCTTTTGGCG AACAGAACAC TGACCTCTC TGATTGATTC CACACTGCAG ACAATATACA 7440
 GGCTATCCAA GGGACGTTCC CTCACCAAAG CACAAAGGGA CACTATAGAA GAATGTTTGC 7500
 TTGCCATTG CAATCACTTG AGGCCTTCCA TGTTACAGCA ACTCCTGCGA CGCCTCGTTT 7560
 TTGATGTGCC GCAACTCAAT GAATACTGCA AAATGCCTCT CAAGCTTCTG ACGAATCACT 7620
 ATGAACAGTG TTGGAAGTAT TACTGCCTGC CTTCAGGATG GGGGAGCTAC GGGCTAGCTG 7680
 TGGAAGAAGA GCTGCACCTA ACGGAGAAGC TTTTCTGGGG GATTATGAC TCGCTCTCCC 7740
 ATAAGAAATA TGACCCAGAT CTTTTCCGAA TGGCCCTGCC TTGTCTCAGT GCTATAGCTG 7800
 GGGCCTTGCC ACCAGATTAT TTAGATTCCA GAATCAGAG CAGTTGGAG AAACAGATCT 7860
 CAGTGGATGC GGATGGCAAC TTTGACCCAA AACCTATTAA CACCATGAAT TTTTCTTTC 7920
 CTGAAAAATT GGAATACATC GTCACCAAGT ATGCTGAGCA TTCACATGAT AAATGGGCCT 7980

Fig. 8c

GTGACAAGAG TCAGAGTGGA TGGAAATATG GGATTTCCTT GGATGAAAAT GTGAAGACCC 8040
 ACCCACTGAT AAGGCCTTTC AAGACATTAA CGGAGAAGGA GAAGGAAATT TATCGCTGGC 8100
 CTGCGCGAGA GTCCCTGAAA ACCATGCTGG CTGTGGGCTG GACTGTGGAG AGGACCAAAG 8160
 AGGGAGAAGC TTTGGTTCAA CAGCGGGAAA ATGAGAAGCT TCGAAGTGTG TCCCAGGCCA 8220
 ACCAGGGCAA CAGCTACAGT CCTGCTCCCC TCGACCTCTC AAACGTTGTG CTCTCCAGAG 8280
 AGCTCCAGGG AATGGTGGAG GTCGTGGCTG AGAACTATCA CAATATCTGG GCCAAGAAGA 8340
 AGAAGCTGGA GCTGGAGAGC AAAGGTGGTG GCAGCCACCC TCTTCTGGTA CCATATGACA 8400
 CCTTGACTGC CAAGGAAAAG TTCAAGGACC GGGAGAAGGC ACAGGACCTG TTTAAGTTCC 8460
 TCCAAGTGAA TGGCATCATA GTTTCAGGG GTATGAAGGA TATGGAGCTG GATGCCTCCT 8520
 CCATGGAGAA GAGGTTTGGC TATAAGTTCT TGAAGAAGAT CCTGAAATAC GTTGATTCTG 8580
 CTCAAGAATT TATTGCCCAT TTAGAAGCCA TTGTCAGCAG TGGGAAAAC TGAAGTCTC 8640
 CCCGTGACCA GGAGATCAAA TTCTTTGCCA AAGTTCTCCT CCGCTGGTT GACCAGTACT 8700
 TCACCAGTCA TTGCCTCTAC TTCTTGTTCAT CCCCTCTGAA GCCCCTTAGC AGCAGCGGAT 8760
 ATGCCTCCCA TAAGGAGAAA GAAATGGTGG CCGGCTGTT CTGCAAACTT GCCGCTCTCG 8820
 TTAGACACAG AATTTCCTC TTTGGTAGTG ATTCTACTAC AATGGTGAGC TGTCTTCACA 8880
 TCTTAGCTCA GACACTTGAC ACAAGGACTG TCATGAAGTC AGGCTCAGAG CTGGTGAAGG 8940
 CTGGGTTACG AGCATCTTTT GAAAATGCTG CAGAAGATTT GGAGAAGACT TCAGAAAACC 9000
 TGAAACTTGG GAAGTTCACC CATTCCCGAA CGCAGATTAA AGGCGTTTCT CAGAATATTA 9060
 ACTACACTAC AGTGGCTCTG CTCCCCATCC TGACGTCCAT CTTTGAGCAC GTCACTCAGC 9120
 ATCAGTTTGG AATGGATCTA CTC'TGGGTG ATGTGCAGAT TTCATGCTAC CACATACTGT 9180
 GCAGCCTCTA CTCCCTTGGG ACGGGAAGA ACATTTATGT TGAAAGGCAA CGCCCTGCCC 9240
 TTGGAGAATG TCTGGCCTCG CTGGCAGCTG CCATACCAGT GGCACTCCTG GAGCCCACCC 9300
 TTAATCGCTA CAATCCACTC TCGGTCTTCA ACACCAAAC CCCAGGGAG AGGTCTATTC 9360
 TGGGGATGCC AGACACGGTA GAAGACATGT GTCTTGACAT CCCCAGCTG GAAGGCCTGA 9420
 TGAAGGAAAT CAACGACCTG GCCGAGTCAG GGGCCCGTA CACAGAGATG CCCCATGTCA 9480
 TCGAGGTGAT CTTACCCATG CTCTGCAACT ACTGTCTTA CTGGTGGGAG CGGGGTCTCTG 9540
 AGAACCTGCC CCCCAGCACA GGGCCATGCT GCACCAAGGT CACCTCTGAA CACCTCAGTC 9600
 TCATCCTGGG CAACATTCTG AAAATCATCA ACAACAACCT GGGCATCGAT GAGGCCTCCT 9660
 GGATGAAGCG CATGTGAGTG TATGCACAGC CCATCATCAG CAAAGCCAGG CCCGACCTGC 9720
 TGAGAAGCCA CTTTCATCCA ACTCTGGAGA AGCTGAAGAA AAAGGCTGTC AAGACGGTGC 9780
 AGGAGGAGGA GCAGTTGAAA GCCGATGGCA AAGGGGACAC CCAGGAGGCA GAACTCCTCA 9840
 TCCTGGACGA GTTCGCGGTC CTCTGCAGAG ATCTCTATGC CTTCTACCCC ATGCTGATCC 9900
 GCTACGTGGA CAACAACAGA TCTAACTGGC TGAAAAGTCC TGATGCTGAT TCTGACCAGC 9960

Fig. 8f.

TCTTCCGCAT GGTGGCAGAA GTCTTCATTC TGTGGTGTA ATCTCATAAC TTCAAGAGAG 10020
 AAGAGCAAAA TTTTGTGATT CAGAATGAAA TTAATAATTT GGCATTTTTA ACTGGAGACA 10080
 GCAAAAGCAA GATGTCAAAA TCTGGAGGAC AAGACCAGGA GCGGAAGAAG ACAAAGCGGC 10140
 GGGGAGACTT GTATTCCATC CAGACCTCCC TCATCGTGGC TGCACTCAAG AAAATGCTGC 10200
 CCATTGGTTT GAATATGTGT ACTCCAGGCG ACCAGGAGCT GATCTCCCTC GCAAAATCGC 10260
 GATACAGCCA TAGGGACACA GATGAAGAGG TCAGAGAACA TCTGCGGAAC AACTTGCACT 10320
 TGCAGGAAAA GTCTGATGAC CCAGCTGTAA AATGGCAACT GAACCTCTAC AAGGATGTTT 10380
 TGAAGAGTGA AGAACCTTTC AATCCGGAAA AGACAGTGGA GCGTGTGCAG AGAATTTTCA 10440
 CAGCTGTCTT CCACCTGGAA CAGGTGGAAC AGCCTTTGAG GTCCAAGAAG GCCGTCTGGC 10500
 ACAAAGTGT ATCAAAGCAA CGGAAACGGG CAGTGGTGGC CTGTTTCAGG ATGGCCCCCTC 10560
 TCTACAACCT GCCCAGGCAC CGCTCTATTA ACCTCTTCCT CCATGGCTAT CAGAGATTTT 10620
 GGATAGAAAC AGAGGAGTAT TCCTTTGAAG AGAACTAGT ACAGGATTTG GCTAAATCTC 10680
 CAAAGGTGGA AGAGGAGGAG GAGGAAGAGA CAGAAAAACA ACCTGACCCA CTACATCAGA 10740
 TCATTCTCTA TTTTAGCCGC AACGCTCTCA CGGAGAGGAG CAAATTGGAA GACGACCCCT 10800
 TGTACACCTC CTATTCCAGC ATGATGGCCA AGAGTTGTCA AAGTGGTGAG GATGAAGAAG 10860
 AAGATGAAGA CAAGGAAAAA ACATTTGAAG AGAAAGAGAT GGAGAAGCAA AAAACCCCTCT 10920
 ATCAGCAAGC TCGGCTGCAT GAGCGTGGTG CTGCAGAGAT GGTCCCTTCAG ATGATAAGCG 10980
 CTAGCAAAGG TGAGATGAGC OCCATGGTGG TTGAGACGCT GAAGCTGGGG ATCGCCATTC 11040
 TGAACGGAGG CAATGCTGGT GTGCAACAGA AAATGCTAGA TTACCTAAAG GAGAAAAAGG 11100
 ATGCTGGATT CTTTCAAAGC CTTCTGGTC TTATGCAGTC TTGCAGCGTC CTTGATTTGA 11160
 ATGCATCTGA GAGGCAGAAT AAAGCTGAAG GCCTGGGGAT GGTGACTGAA GAAGGAACAC 11220
 TCATTGTTTCG GGAACGTGGT GAAAAAGTAC TCCAGAAATGA CGAGTTCACG CGTGATCTCT 11280
 TTAGATTCTT ACAGTTACTT TGTGAGGGAC ATAACAGTGA CTTTCAGAAC TTCTTGCGGA 11340
 CTCAGATGGG CAACACCACC ACCGTGAATG TCATCATCAG CACTGTGGAC TACCTTCTGC 11400
 GTCTGCAGGA ATCAATCAGT GATTTCTACT GGTATTATTC AGGGAAGGAC ATCATTGATG 11460
 AATCTGGACA GCACAATTTT TCCAAAGCTC TGGCAGTCAC CAAGCAGATT TTCAATTCTC 11520
 TTACAGAATA CATCCAGGGC CTTTCATTG GTAATCAACA GAGCCTGGCT CACAGCAGGC 11580
 TGTGGGACGC AGTGGTTGGC TTCTCCATG TCTTTGCTAA TATGCAGATG AAACCTCTCTC 11640
 AGGATTCAG TCAGATCGAG CTGCTGAAGG AACTCTTGGA TCTCCTTCAG GACATGGTGG 11700
 TGATGCTTCT GTCCCTCCTG GAAGGGAATG TGGTAAATGG CACCATGGC AAGCAGATGG 11760
 TTGACACACT GGTAGAATCA TCTACCAATG TAGAAATGAT CTTGAAATTC TTGACATGT 11820
 TCTTGAAACT TAAAGACTTA ACCAGCTCAG ACACCTTCAA AGAATATGAC CCAGATGGTA 11880
 AAGGAATTAT CTCCAAAAA GAATTCCAGA AGGCCATGGA AGGGCAAAAA CAGTACACGC 11940
 AGTCAGAGAT TGACTTTCTC CTGTCGTGTG CAGAAGCTGA TGAGAATGAC ATGTTTAAAT 12000

Fig. 8g

ACGTTGATTT TGTAGACCGG TTCCATGAGC CAGCCAAGGA CATAGGGTTT AATGTGGCTG 12060
 TGTATTGAC AAATCTTTCT GAACACATGC CAAACGATTC CCGCCTGAAG TGTCTGTTGG 12120
 ACCCAGCAGA AAGTGTGCTA AATTACTTCG GACCCTACCT AGGACGCATC GAGATCATGG 12180
 GTGGGGCCAA GAAGATTGAG CGTGTTTATT TTGAGATCAG TGAATCCAGT CGCACTCAGT 12240
 GGGAGAAGCC CCAGGTGAAG GAATCTAAGC GACAGTTCAT TTTTGATGTT GTCAATGAAG 12300
 GTGGGGAGCA GGAAAAGATG GGGCTGTTTG TGAACCTCTG TGAGGACACC ATCTTTGAAA 12360
 TGCAGTTAGC ATCTCAGATC TCTGAATCCG ATTCAGCTGA CAGGCCAGAA GAGGAGGAAG 12420
 AAGATGAAGA TTCTTCTTAC GTGTTAGAAA TTGCGGTGA AGAGGAAGAA GACGGGTCTC 12480
 TTGAGCCGGC CTCTGCATTT GCTATGGCCT GTGCCTCTGT GAAGAGGAAT GTCACCGACT 12540
 TCCTGAAGAG AGCAACCTG AAGAACCTCA GGAAGCAGTA CAGGAACGTG AAAAAGATGA 12600
 CTGCGAAGGA GCTGGTGAAG GTGCTCTTCT CCTTTTTCTG GATGCTGTTT GTGGGGCTAT 12660
 TCCAGTTGCT CTTCACCATC CTGGGAGGAA TCTTTCAGAT CCTCTGGAGC ACAGTGTPTG 12720
 GAGGGGGCCT GGTAGAAGGG GCAAAGAACA TCAGAGTGAC CAAGATCCTG GGTGACATGC 12780
 CTGACCCAAC CCAATTGGT ATCCATGATG ACACTATGGA GGCTGAGAGG GCAGAGGTGA 12840
 TGGAGCCAGG TATCACCACCT GAAC TAGTAC ACTTCATAAA GGGGGAGAAG GGAGATACAG 12900
 ATATCATGTC AGACCTCTTT GGACTCCACC CAAAGAAAGA GGGCAGCTTA AAGCATGGGC 12960
 CTGAAGTGGG TTTGGGTGAC CTCTCAGAAA TTAATTGGCAA GGATGAACCC CTTACATTAG 13020
 AGAGTACTGT ACAGAAGAAG AGGAAAGCTC AGGCAGCAGA AATGAAAGCA GCAAATGAAG 13080
 CAGAAGGAAA AGTAGAATCC GAGAAGGCAG ACATGGAAGA TGGAGAGAAG GAAGACAAAG 13140
 ACAAAGAAGA GGAGCAAGCT GAGTACCTGT GGACAGAAGT GACAAAAAAG AAGAAGCGGC 13200
 GGTGTGGTCA GAAGGTTGAG AAGCCGGAAG CTTTCACAGC CAATTTCTTT AAAGGGCTGG 13260
 AAATCTATCA GACCAAGTTA CTGCATTACC TGGCCAGGAA TTTCTACAAC CTGAGGTTCC 13320
 TTGCTCTGTT TGTAGCCTTC GCTATCAACT TCATCTCTCT TTTTATAAG GTCACTGAAG 13380
 AACCTTTAGA AGAAGAGACA GAGGATGTTG CAAACCTATG GAATTCCTTT AATGACGAGG 13440
 AAGAGGAAGA AGCGATGGTA TTCTTTGTCC TTCAGGAGAG CACCGGGTAT ATGGACCAA 13500
 CCCTGCGTGC CCTGGCCATC ATCCATACCA TCATCTCTCT AGTCTGTGTG GTGGGCTACT 13560
 ACTGCCTGAA GGTGCCTTTG GTGGTTTCA AAAGGGAAAA AGAAATCGCC AGGAAGCTGG 13620
 AGTTTGATGG CCTATATATC ACCGAACAGC CATCTGAAGA TGACATCAAG GGCAGTGGG 13680
 ACCCCTTGGT GATCAACACA CCATCTTTTC CTAATAACTA CTGGGACAAG TTTGTAAAGA 13740
 GAAAGGTGAT CAACAAGTAT GGAGATCTCT ACGGAGCAGA ACGCATTGCT GAACTTCTGG 13800
 GTTTGGACAA AAATGCTCTT GACTTTAGCC CAGTAGAAGA GACCAAAGCA GAAGCGGCTT 13860
 CTCGGTGTG ATGGCTAAGT TCCTTAGACA TGAAGTACCA TATCTGGAAG CTTGGAGTTG 13920
 TTTTACTGA CAACTCCTTT CTCTACCTTG CTTGGTATAC AACCATGTCA GTCTGGGOC 13980

Fig. 8k

ACTACAATAA CTTCCTCTTT GCTGCTCACC TATTGGACAT CGCAATGGGC TTCAAGACAC 14040
 TGAGGACCAT TCTGTCATCT GTAACTCACA ATGGCAAACA GTTGGTTCTG ACTGTCGGTC 14100
 TCCTGGCCGT GGTGGTTTAT CTCTATACTG TGGTGGCTTT CAACTTCTTC CGCAAGTTCT 14160
 ACAACAAAAG CGAAGACGAT GACGAGCCCG ATATGAAGTG CGACGACATG ATGACGTGTT 14220
 ACCTTTTCCA CATGTACGTG GGAGTGAGAG CAGGAGGTGG CATTTGGTGAT GAAATTGAAG 14280
 ACCCTGCTGG TGATCCTTAT GAAATGTATC GCATTGTCTT TGACATTACC TTTTCTTCT 14340
 TCGTCATTGT CATCTTGCTG GCCATCATT CAGGTCTTAT TATTGATGCT TTCGGAGAGC 14400
 TAAGAGACCA GCAGGAACAA GTACGAGAAG ATATGGAGAC TAAATGTTTC ATCTGTGGGA 14460
 TTGGCAATGA CTACTTTGAC ACAACCCCTC ATGGTTTGA AACACATACA TTACAAGAGC 14520
 ACAACTTAGC CAACTACTTG TTCTTTCTGA TGTATTTGAT TAATAAAGAT GAAACAGAGC 14580
 ACACGGGTCA GGAATCTTAT GTCTGGAAGA TGTACCAAGA AAGGTGTTGG GATTTCTTCC 14640
 CAGCCGGTGA CTGCTTTCGT AAACAATATG AAGATCAGCT TGGATAAATC TGAATCAAAG 14700
 AAGCGCGACA ATTCTGGACA GTCAACTTCC CATGAAATAA AGTCCCCTTT TTACAGTTCT 14760
 GCAACATATC TGAAATGTGA CATTTTCTAA ATGCCTCCCT TAAAAAATAA ACTGCTGAAA 14820
 ATCTGTGCTA TTTTGAAATT GATTTGGCTT TTGTGCTA ATGGACATAC ACTGTGGGAG 14880
 AGAACCTGTC AAAATGTCGA AGAAGGAAGG CGAAGAATCA AGTAATCTCT AGGCAAATGC 14940
 CTTCAAGTTT TCCAGTTCTG AGGTAAC TAGTTCAGTTGT TGGGATGGAA GCATGAAGGA 15000
 AAGGGCTAGA GAAGTATGAA ATCTCGAATG TGTAATACCT GAAAATTTAA ACACTTGAAT 15060
 GTCATCATGG TATCCAACTT GTGACTCATA GGGTCTGAAC TCCAAAAGAT AATAACTGCA 15120
 GTCTAATTTT TCCCATGGTA CTGCTAGTG ACTGTATCCA GAAAAGCTTT AAGCAGTTAA 15180
 AGAAACAGAA AAAAACCGAC ACTTTGTCGA CACTGAAATA TCGATTAAAGT GCCTTAAAAC 15240
 CTCTTTAGAC ATAGCTATGC AAGTTTTTTA TGTGTTGTGTT CCAGAAGGAC AGTTCCATTC 15300
 ATTAGTTGTG ATCTTCCGTC TTACTTTATG AAACTGCACT TGAAGGTTAT TCATACAAGT 15360
 TTTTGTAGTA ACAGCTGTCA GTCAACTGCT GTTATTAGAA GAAAAGTACT GTACTGAAAA 15420
 TTCAAAAAAA AATCTCAACC TTATGCCAAA ATGGAGTAAT GCTTTATGGT CCCTTGTAAG 15480
 TAGTGGAGCT GCTCTGTTTA GGTGAATCTC CTCAAATACA GTGAAGTGCC CACTGCAATA 15540
 AAGTAATACG TGCCAATAAA AAAAAAAAAA AA

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)